

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001165939 A**

(43) Date of publication of application: **22.06.01**

(51) Int. Cl

G01N 35/08

G01N 1/00

G01N 25/16

G01N 31/20

(21) Application number: **11352445**

(22) Date of filing: **10.12.99**

(71) Applicant: **ASAHI KASEI CORP**

(72) Inventor: **KITAGUCHI NOBUYA
KANAKAWA AKITAKA**

(54) CAPILLARY ANALYZER

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a μ TAS analyzer which can be used for point-of-care(POC) analysis, etc., and is provided with a convenient inexpensive quantitative liquid feeding system having a simple structure, and can make flow velocity control and flow ration control.

SOLUTION: This μ TAS analyzer uses the gravity as liquid feeding power and adjusts the surface level of a liquid in a liquid reservoir connected to a micro-flow

passage, by using a planar chip for controlling the liquid feeding power. Since the method of adjusting the liquid quantity in the liquid reservoir and another method of inclining an analysis chip by a prescribed angle in a prescribed direction for adjusting the surface level are used as a surface level adjusting method, stable liquid feeding is realized, and analysis becomes possible in the micro-flow passage. It is desirable to use a photothermal conversion method, especially a thermal lens method for detection.

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-165939

(P2001-165939A)

(43)公開日 平成13年6月22日(2001.6.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
G 0 1 N 35/08		G 0 1 N 35/08	A 2 G 0 4 0
1/00	1 0 1	1/00	1 0 1 G 2 G 0 4 2
25/16		25/16	C 2 G 0 5 8
31/20		31/20	

審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 19 頁)

(21)出願番号 特願平11-352445

(22)出願日 平成11年12月10日(1999.12.10)

(71)出願人 000000033

旭化成株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 北口 暢哉

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業
株式会社内

(72)発明者 金川 章孝

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業
株式会社内

Fターム(参考) 2G040 AA02 AB12 BA01 BA24 EA01

2G042 AA01 BD19 CA10 CB03 DA09

DA10 FB02 HA02

2G058 CC00 CC11 DA07 GA06 GA12

(54)【発明の名称】 キャピラリー分析装置

(57)【要約】

【課題】 ポイントオブケア(POC)分析等へ用いる、構造が単純で、簡便で安価な定量的送液システムを備えた、流速制御、流量比制御が可能な μ TAS分析装置を提供することを目的とする。

【解決手段】 重力を送液駆動力とし、その制御のために、平板チップを用い、マイクロ流路につながる液溜中の液面高を調節する。その調節法として、液溜中の液量を調節する方法及び、分析チップを所定角度、所定の方
向に傾斜させる方法を用いることで、安定した送液が実現でき、マイクロ流路中での分析が可能となった。検出には、光熱変換法、とりわけ熱レンズ法を、適用することが望ましい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも一方がその板面に溝を備えた一対の平板状部材を、前記溝を備えた板面を内側にして張り合わせることににより構成されるキャピラリを備えたチップを用いて、前記キャピラリ内に液体状の試料、もしくは、液体状の試料および液体状の試薬を、各液体リザーバーから廃液溜に向かって流して、前記試料中、もしくは、前記試料および前記試薬の混合液体中の所定成分を分析する分析装置において、チップ内の液体を移動させる駆動力として、液体にかかる重力を用いることを特徴とする分析装置。

【請求項2】 前記液体リザーバー液面が廃液溜液面よりも、重力に対して高い位置にあり、その液面の高低差による水圧を前記駆動力とする請求項1記載の分析装置。

【請求項3】 前記試薬及び前記試料を所定比率または所定濃度で混合し、もしくは、混合後さらに所定時間反応させるように、前記試薬及び前記試料の流速を、前記液面の高低差とキャピラリーの圧力損失により調整することを特徴とする請求項1から2記載の分析装置。

【請求項4】 実質的に水平においた前記チップ中の、前記液体リザーバー内の液体量を調節することによって、前記液面の高低差を制御することを特徴とする請求項1から3記載の分析装置。

【請求項5】 前記チップの傾斜角度と方向を制御することによって、前記液面の高低差を調節し、前記チップ内の液流れを制御することを特徴とする請求項1から3記載の分析装置。

【請求項6】 前記液体リザーバーには、気体のみが出入りできるベントが備えられており、前記ベントの気体出口を塞ぐことにより、前記液体リザーバーからの液体の流出を止め、また、前記ベントの気体出口を開放する事により、前記液体リザーバーからの液体の流出を可能とする調節機構を備えた請求項1から5記載の分析装置。

【請求項7】 前記キャピラリは、前記試料を流す試料流路と、前記分析を行う流路とを有することに加えて、前記試料流路と前記分析を行う流路との間に、少なくとも一つの試薬混合手段を有し、前記試薬混合手段は、前記試薬を流す少なくとも一つの試薬流路と、前記試料流路側から流れてくる液体と前記試薬流路から流れてくる前記試薬との合流点と、この合流点より下流側に設けられ、前記試料流路側から流れてくる液体と前記試薬流路から流れてくる前記試薬とを所定比率で混合して所定時間反応させる混合流路と、から構成され、前記試薬混合手段が複数の場合には、各試薬混合手段は直列関係に配設されることを特徴とする請求項1から6に記載の分析装置。

【請求項8】 前記試料と前記試薬を所定比率で混合後、混合後の液体の流れを実質的に止めて、所定時間反

応させることを特徴とする請求項1から7記載の分析装置。

【請求項9】 前記試料と前記試薬を所定比率で混合後、混合後の液体の流れを実質的に止めて、流路内で反応させつつ、反応の進行程度を経時的に測定することを特徴とする請求項1から8記載の分析装置。

【請求項10】 前記キャピラリは、前記試料と前記試薬とが連続的に流され、前記混合流路は、その直前の合流点で合流した液体が、所定の流速下で、所定の混合および反応を終了するために必要な時間流動するのに十分な長さの流路であることを特徴とする請求項7に記載の分析装置。

【請求項11】 前記試料流路と前記試薬流路の流速が、実質的に同等になるように、試料及び試薬の液体リザーバー間の液面差と、前記試料流路及び前記試薬流路の流路抵抗が調節されていることを特徴とする請求項1から10に記載の分析装置。

【請求項12】 前記流路抵抗の調節が、各流路の断面積と各流路の長さを変えることによって行われることを特徴とする請求項11に記載の分析装置。

【請求項13】 前記所定成分に励起光を照射して、その結果生じる前記キャピラリ内の部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定することを特徴とする請求項1から12記載の分析装置。

【請求項14】 前記物理量変化が屈折率変化であり、前記光熱変換検出装置は、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出光を入射させ、前記熱レンズにより生じる前記検出光の変化を測定する装置であることを特徴とする請求項13に記載の分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微量試料の分析、検出を簡便に行う分析装置に関する。

【0002】

【従来の技術】医療診断に必要な測定を患者近傍で行うベッドサイド診断用の分析(POC(point of care)分析)や、河川や廃棄物中の有害物質の分析を河川や廃棄物処理場等の現場で行うこと(POU(point of use)分析)や、食品の調理、収穫、輸入の各現場における汚染検査等の、分析・計測が必要とされる現場、もしくは現場の近傍で、分析・計測を行うこと(以下、「POC分析等」と総称する)の重要性が注目されており、近年、このようなPOC分析等に適用される検出法や装置の開発が重要視されつつある。このようなPOC分析等は、簡便に短時間で、且つ低コストで行われることが要求される。

【0003】従来の微量分析法としては、試料を、キャピラリガスクロマトグラフィー(CGC)、キャピラリ液体クロマトグラフィー(CLC)等で分離した後、質量分析計で定量するGCMS装置やLCMS装置が広く

使用されてきた。しかしながら、これらの分析装置は質量分析計が大きいこと、および操作が煩雑であることから、患者のベッドサイドや汚染河川、廃棄物処理場近辺等の測定現場で使用するのには適さない。さらに、血液等を試料とする医療診断用途の分析装置は、試料が触れる部分を使い捨てにすることが望ましい。

【0004】これらの問題点を解決するために、従来利用されてきた分析装置を小型化し、液体試薬を極微量反応させる μ TAS(micro total analysis system)の技術をPOC分析等へ応用する検討が進んできた。 μ TASでは、血液に限らず検体量を微量にするために、10センチから数センチ角程度以下のガラスやシリコンのチップ表面に溝を刻んで、その溝中に試薬溶液や検体を流して、分離、反応を行って、微量試料の分析を行っている(特開平2-245655号、特開平3-226666号 Stanford大、特開平8-233778号島津、Analytical Chem. 69, 2626-2630 (1997)Aclara Biosciencesなど)。この技術では、検体量、検出に必要な試薬量、検出に用いた消耗品等の廃棄物、廃液の量がいずれも少なくなる上、検出に必要な時間もおおむね短時間で済むという利点がある。

【0005】本願出願人も、「混合分析装置および混合分析方法」特願平10-181586号、「キャピラリー光熱変換分析装置」特願平10-181587号、「分析装置」特願平10-167603号、PCT/J P99/03158、「分析用カートリッジ及び送液制御装置」特願平11-227624号等の μ TAS関係の発明を出願している。これらの出願明細書では、チップとして樹脂製のマイクロチップを用いることや、微量成分の検出法として、熱レンズ検出法を用いる事なども記載されている。熱レンズ検出法は、励起光で液体中の試料を励起して、いわゆる熱レンズを形成させ、検出光でその熱レンズの変化を測定する光熱変換検出法(熱レンズ検出法)であり、その原理等は以前から知られている(日本国特許公開公報 昭和60年第174933号、A. C. Boccarda et. al., Appl. Phys. Lett. 36, 130, 1980、J. Liquid Chromatography 12, 2575-2585(1989)、日本国特許公開公報 平成10年第142177号、日本国特許公開公報 平成4年第369467号、Anal. Chem. 65, 2938-2940, 1993、ぶんせきNo. 4, 280-284, 1997、M. Harada, et. al., Anal. Chem. Vol. 65, 2938-2940, 1993、川西、他 日本分析化学会第44年会講演要旨集, p119, 1995など)。キャピラリー中の成分を測定する方法としては、熱レンズの他に、蛍光法や吸光度法等も用いることができるが、光路長が短いキャピラリーでは、蛍光標識などの必要がない熱レンズ法が適している。

【0006】一方、チップ内の液体を移動させる技術と

しては、チップ外の送液ポンプまたは吸引ポンプを用いて、チップ中キャピラリー内の送液を行う方法が一般的である(例えばS. Shoji, et. al., Sensors & Actuators B8, 205-208, 1994、ぶんせきNo. 4, 280-284, 1997、M. Harada, et. al., Anal. Chem. Vol. 65, 2938-2940, 1993、川西、他 日本分析化学会第44年会講演要旨集, p119, 1995等)。また、チップのキャピラリーの終末端に、チップ外部の液溜を接続し、接続部分を液で満たして、サイフォン現象を用いて吸引する力によって、チップ内の送液を行うことも報告されている(センサ・アクチュエータ/ウィーク'97総合シンポジウム、マイクロセンサ、Session3要旨集19-23頁「化学の集積化をめざして」北森武彦、澤田嗣郎。主催：次世代センサ協議会、1997)。

【0007】これらの方法、とくに外部ポンプを用いる方法では、制御の即応性、連続的な変化、耐久性、医療現場においては重要な静粛性、等の点で問題がある。送液、吸引ポンプのため装置全体が大きくなることや、チップと外部ポンプとの接続部分での漏れの恐れもある。外部ポンプやサイフォン等、外部との液の流通が必要な装置では、チップ外部に廃液溜や試薬溶液、緩衝液溜等を設ける必要があり、液の補給は廃棄、清掃など、その液溜のメンテナンスが必要になることである。このことは、POC分析等において、簡便性を著しく損なうことになる。また、チップ外の液溜によるサイフォンの場合は、貯まった液の廃棄の他に、サイフォンを成立させるため、チップと外部液溜を接続するチューブの空気抜きなどの手間が、チップを交換する毎に発生することになる。

【0008】一方、チップ中で、キャピラリー電気泳動そのものや、電気浸透流を用いて電圧をかけることによって送液する方法も提案されている(WO96/04547 Martin Energy Systems, Caliper社、や S. C. Jakobson, et. al., Anal. Chem. Vol. 66, 4127-4132, 1994、J. Liquid Chromatography 12, 2575-2585(1989)、日本国特許公開公報 平成10年第142177号 分子バイオホトニクス社、日本国特許公開公報 平成4年第369467号 横河電機社など)。電気泳動も電気浸透流も、チップ内の液体に電極を介して電圧をかけるため、電極表面での、測定試薬や測定試料の電気分解が生じて、試薬組成や試料組成が変化してしまうことがある。さらに、試薬や試料の電気分解生成物が、キャピラリーの内面に付着して、キャピラリー表面のゼータ電位を変えてしまい、送液速度が変化するという現象が起こる場合もある。

【0009】カートリッジ内に、凍結乾燥した固体試薬を入れておき、カートリッジ内に封入した溶解希釈液

で、血液検体を希釈し、さらに該希釈検体液で該固体試薬を溶解して、分析反応を行わせ定量する方法が開示されている（アバクシス社、特表平10-501340号、特表平9-504732号等）。この方法では、送液は遠心力により行われているため、送液方向は常に遠心力の働く方向、つまり、円形カートリッジの円の中心から外に向かってである。固体試薬はカートリッジ中の流路末端に位置する、円周沿いの小部屋内におかれており、希釈された検体が、各小部屋に流入して、固体試薬を溶解し、反応して吸光度に変化を来すようになっている。構造上、送液の最終点に固体試薬がおかれているため、1試薬組成の1段反応でしか、検出反応が行えず、検出項目によっては、検査センターや病院の臨床検査室などで行われている、学会や官庁などで定められた推奨法による検出反応とは異なる反応及び試薬組成を採用せざるを得ない。そのため、従来の検査データとの相関が悪い場合がある。さらに、検査項目によっては、このような円形カートリッジの反応様式では分析が困難な場合も考えられる。

【0010】また、遠心力による送液の他の方法として、流路途中に、溝を細くして表面張力で閉となっているバルブや、ワックスで流路を塞ぐバルブを設けて送液を制御する技術も知られている（WO 98/53311やWO 97/21090など。いずれもGAMERABioscience社）。表面張力によるバルブでは、界面活性剤入りの試薬溶液では、容易にバルブが開となってしまって調節が難しくなるという問題があり、ワックスを用いたバルブでは、流路が太くなる、ワックスを溶かす加熱機構が必要になる、液体中の成分がワックスに吸着する、等の問題がある。さらに、これらのバルブは一旦開となると閉にはできない。

【0011】また、チップ外部の吸排気ポンプにより、チップ内の血漿を移動させる方法も開示されている（日本メディフィジックス社 特開平9-196920号（免疫項目）、同8-114539号（生化学項目）、同9-196739号（溶解液先端検知）、同9-138195号（多孔性材料の透過光測定による分析）など）。この方法では、血漿そのもので付着試薬を溶解しながら反応を同時に行う構造になっているが、主たる送液方法として、流路終端からの減圧吸引・加圧が採用されている。この方法では、空気を介してチップ内の送液が調節されるため、チップ外部と送液のための液体をやりとりする必要がない。しかしながら、チップ外に送液用の吸排気ポンプを必要とすること、チップと吸排気ポンプとのインターフェース（漏れない接続部構造）が必要という問題がある。

【0012】また、分析カートリッジ中の液体の移動に、重力と毛細管力（表面張力）を採用した例もある（平成10年の特許番号2790359号、ベーリンガーマンハイム社）。このヘモグロビンA1c(HbA1c)測定用カートリッジでは、カートリッジに封入された液体試薬をブレイカブルシールを破って所定体積の希釈槽に導き、所定体積の毛細管中の検体とを混合して、溶血後のHb測定

とそれに続くラテックスビーズによるHbA1c測定を行っている。重力を駆動力として用いることは、チップ外の送液ポンプや電源などが不要で、安価な送液が実現できる利点がある。

【0013】しかし、このカートリッジに於ける送液は、重力に従って一つの液槽から別の液槽に液が落ちていくだけの移動する手段であり、流量を定量的に制御することによる定量的送液ではなく、カートリッジ（チップ）内の定量的混合、反応には適さない。さらに、カートリッジの構造が極めて複雑であり、組立が容易ではない。この程度に複雑な構造を精度良く組み立てるには、流路はmmオーダーである必要があり、それに伴って試薬量も多くなる。

【0014】さらに、 μ TASの送液技術として、マイクロチップでの重力による液移動に言及した論文もある。溝断面積が大きく、流路長も長くなって圧損が少ない流路に対しては、チップ内流路への液の張り込みに重力を用いて、リザーバーから液を落とし込むこともあるが、定量的な送液ではない。また、重力による液移動は、電気浸透流における望ましくない外乱要因として取り扱われており、その外乱要因を除くため、電気浸透流を発生することができるポーラスポリマー性の栓(monolith)でキャピラリーを塞いで、重力による液移動を実質上ゼロにする方法が報告されている（SPIE's International Symposium on Micromachining and Microfabrication, 1999, Y. Fintschenko他、[3877-29] Proceedings of SPIE Volume 3877等）。この報告では、ここでは、定量的送液に電気浸透流を用るのであって、重力を用いて定量的送液をチップ中で行う記載はない。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、POC分析等へ用いる、構造が単純で、簡便で安価な定量的送液システムを備えた、流速制御、流量比制御が可能な μ TAS分析装置を提供することを目的とする。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、少なくとも一方がその板面に溝を備えた一对の平板状部材からなるチップを用いれば、その溝が形成するキャピラリー内に液体状の試料、もしくは、液体状の試料および液体状の試薬を各液体リザーバーから廃液溜に向かって流す送液の駆動力として、安価な駆動力である、液体にかかる重力を用いることができ、しかもその駆動力を容易に制御する方法を見だし、定量的な送液や混合、さらには反応が可能にして本発明を完成した。つまり、平面上に存在し、適度な圧力損失を有するキャピラリーを用いれば、安価な重力を駆動力として、定量的な制御ができることを見だし、本発明に至った。

【0017】即ち本発明は、少なくとも一方がその板面に溝を備えた一对の平板状部材を、前記溝を備えた板面

を内側にして張り合わせるにより構成されるキャピラリー内に液体状の試料、もしくは、液体状の試料および液体状の試薬を、各液体リザーバーから廃液溜に向かって流して、前記試料中、もしくは、前記試料および前記試薬の混合液体中の所定成分を分析する分析装置において、チップ内の液体を移動させる駆動力として、液体にかかる重力を用いることを特徴とする分析装置である。

【0018】さらに、本発明は、前記液体リザーバー液面が廃液溜液面よりも、重力に対して高い位置にあり、その液面の高低差による水圧を前記駆動力とする分析装置を提供する。さらに、本発明は、前記液面の高低差と、前記キャピラリーの断面積と長さと液体の粘度及び密度から構成される圧力損失とを調整することによって、前記試薬及び前記試料を所定比率または所定濃度で混合し、もしくは、混合後さらに所定時間反応させるように、前記試薬及び前記試料の流速を制御できる分析装置を提供する。

【0019】さらには、本発明は、前記液面の高低差を制御する方法として、実質的に水平においた前記チップ中の、前記液体リザーバー内の液体量を調節すること、または、前記チップを、水平から所定方向に、所定の傾斜角度で傾けることを用いた分析装置を提供する。また、本発明は、前記液体リザーバーからの液体の流出を、前記液体リザーバーに備えられた、気体のみが出入りできるベントの気体出口の開閉により調節する分析装置を提供する。さらに、本発明の分析装置の流路構造として、以下の特徴を備えた分析装置を提供する。

【0020】即ち、前記キャピラリーは、前記試料を流す試料流路と、前記測定を行う流路とを有することに加えて、前記試料流路と前記測定を行う流路との間に、少なくとも一つの試薬混合手段を有し、前記試薬混合手段は、前記試薬を流す少なくとも一つの試薬流路と、前記試料流路側から流れてくる液体と前記試薬流路から流れてくる前記試薬との合流点と、この合流点より下流側に設けられ、前記試料流路側から流れてくる液体と前記試薬流路から流れてくる前記試薬とを所定比率で混合して所定時間反応させる混合流路と、から構成され、前記試薬混合手段が複数の場合には、各試薬混合手段は直列関係に配設されることを特徴とする流路構造である。

【0021】また、本発明は、前記試料と前記試薬を所定比率で混合後、混合後の液体の流れを実質的に止めて、所定時間反応させてから測定を開始することを特徴とする分析装置を提供する。さらに、本発明は、反応の経時変化から酵素量や酵素活性などを分析するいわゆるレイトアッセイの手段として、前記試料と前記試薬を所定比率で混合後、混合後の液体の流れを実質的に止めて、流路内で反応させつつ、反応の進行程度を経時的に測定することを特徴とする分析装置を提供する。

【0022】また、本発明は、連続的に液体を流しながら反応をさせるために、前記キャピラリーは、前記試料と

前記試薬とが連続的に流され、前記混合流路は、その直前の合流点で合流した液体が、所定の流速下で、所定の混合および反応を終了するために必要な時間流動するのに十分な長さの流路を有するチップを用いた分析装置を提供する。さらに本発明は、前記試料流路と前記試薬流路の流速が、実質的に同等になるように、試料及び試薬の液体リザーバー間の液面差と、前記試料流路及び前記試薬流路の流路抵抗が調節されていることを特徴とし、さらに、この流路抵抗の調節を、各流路の断面積と各流路の長さを変えることによって行うことを特徴とする分析装置を提供する。

【0023】また本発明は、上記分析装置の検出手段として、前記所定成分に励起光を照射して、その結果生じる前記キャピラリー内の部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定することを採用した分析装置を提供する。さらに、本発明は、前記物理量変化が屈折率変化であり、前記光熱変換検出装置は、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出光を入射させ、前記熱レンズにより生じる前記検出光の変化を測定することを特徴とする分析装置を提供する。

【0024】

【発明の実施の形態】本発明について、以下具体的に説明する。 μ TASの技術領域において、チップ中の重力に基づく液移動は、従来、電気浸透流などの外乱要因として捉えられてきた。即ち、電気浸透流によって送液したいキャピラリーに繋がる複数の液体リザーバー間で、チップ中の液体リザーバーの液面高さが異なる場合には、そのリザーバー間で、望ましくない重力による液移動が生じ、所定の電気浸透流による送液速度が乱されてしまう。本発明者らは、液体リザーバー中の液面高さを人為的に制御すれば、重力を用いて、定量的送液及び定量的反応をマイクロチップ中に行えと考え、鋭意検討の結果、本発明を完成した。

【0025】重力は、特段の駆動装置が不要で、安価な送液法となるが、人為的な制御を達成しマイクロチップの送液手段とするには、以下の要件を満たす必要があると本発明者らは考えている。すなわち、1) 重力のかかり方を複雑にしないため、即ち、安定な液流れを実現するため、一平面上に流路が刻まれていること、2) 各液体リザーバーの配置は、正しい流れが生じるように設計されていること、3) 液体リザーバーの液面差は、チップを鉛直に立てた最大傾け時でもチップの長辺の長さしかないもので、この程度の液面差で発生する水圧で流れるよう、流路圧損が小さいこと、4) 逆に、チップ内で拡散を主体として混合し、さらに流路内で反応させるためには、流速はある程度以下で、十分な拡散時間が確保できること、つまり、適度の流路圧損を有すること、を満たす必要がある。

【0026】以下、各要件ごとに詳述する。まず、チップ中の流路が2次元、つまり1平面上にあることであ

る。マイクロポンプのような能動的な駆動力を備えたチップでは、3次元的な流路も可能で、実際に種々検討されているが、重力を駆動力とする場合は、3次元流路は不安定な送液を惹起し、時には送液不能に陥る。流路が一平面にあれば、各液体リザーバーおよび流路内の液体にかかる重力が制御しやすくなる。一平面上の流路を実現するには、少なくとも一方がその板面に溝を備えた一對の平板状部材を、前記溝を備えた板面を内側にして張り合わせるによって達成される。素材は、ガラスでも有機ポリマーでも、その組み合わせでも良い。各液体リザーバーは、上述した平面状チップ中の流路端に、貫通孔をあけ、そのまま、または、貫通孔につながる管を、チップに接着することによって実現できる。チップの素材及び作成の詳細は後述する。

【0027】2番目の要件は、流路と液体リザーバーの位置関係である。流路全体が液体で満たされれば、サイフォンがかかるため、液体リザーバーより高い流路が途中にあっても、次の合流点又は廃液溜が、もとの液体リザーバーより重力的に低い位置にあれば、流れは生じる。

【0028】しかしながら、キャピラリー中に気泡が入ることなどを考えると、液体リザーバから発した流路は、次の合流点または廃液溜までの間で、もとの液体リザーバーより重力的に見て高い部分を有さないことが望ましい。一つの合流点から、より下流の合流点までの流路についても同様に、途中に、もとの合流点より重力的に見て高い流路部分を有さないことが望ましい。つまり、流れは常に、重力的にみて上から下へ、であることが望ましい。

【0029】3番目の要件は、流路圧損が適度に小さいことである。液体リザーバーの液面差は、チップを鉛直に立てた最大傾け時でもチップの長辺の長さしかないので、この程度の液面差で発生する水圧で流れるよう、流路圧損が小さいことが必要である。送液したい液体粘度が高すぎる、流路が細すぎる、流路が長すぎるなどの原因で圧損が大きすぎると、必要な流速が得られず、ひどい場合は流れが全く生じないこともあり得る。

【0030】第4の要件は、チップ内で拡散を主体として混合し、さらに流路内で反応させるためには、流速はある程度以下で有ること、つまり、適度の流路圧損を有することである。幅150 μm 、深さ30 μm 程度のキャピラリーを有する、水平においたチップで、1~2mm程度の各液体リザーバーの液面差をつけると、300 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度以上の流速となり、2つの液体の合流点において、流れの断面方向の拡散により2液の混合が実質的に達成されるまでの流路長がきわめて大きくなる。

【0031】そのため、チップ内に流路全長を納めるためには、チップの面積が大きくなってしまい、簡便性が損なわれ、また、必要試薬量も多くなって、コストアップの要因となる。そのため、適度な圧損が必要となる。

第3と第4の要件について、以下にさらに説明を加える。キャピラリーの圧損（圧力損失）は、この流速と液体粘度とキャピラリーの断面積と長さに基づき、次式によって決まる。

$$dP = QCuL / 2AD^2 \quad (\text{式1})$$

（ dP は圧損 {Pa}、 Q は流量速度 { m^3/s }、 C は係数、 u は動粘度 { $\text{Pa}\cdot\text{s}$ }、 A はキャピラリーの断面積 { m^2 }、 L はキャピラリー長さ { m }、 D は等価水圧直径 { m }）

（Proceedings of SPIE: The International Society for Optical Engineering. Volume 3877, p21, 1999）

【0032】また、チップ内液体の流速については、以下の予測式を導いた。簡単のため、チップ内の流路の合流点で分割される各流路は、同一の、つまり均一な、長方形断面を有する直線流路と考える。その際、圧力損失は流路断面の短辺からのみ生ずるとする。この場合の流路両端の圧力差と、流路内液体に加わる重力によって発生する各直線流路における流速を式化する。ひとつの直線流路の断面の短辺の長さを Y 、流路長を L 、流路両端の圧力差を P 、液体の粘度を u 、液体密度を d 、重力加速度を g 、重力加速度が働く方向での流路両端の高低差を h とすると、ある時間における流路内の平均流速 V は、ナビエ・ストークスの運動方程式より

$$V = (P/L + dgh) Y^2 / 12u \quad (\text{式2})$$

となる。このとき、流路端が液体リザーバーの場合は、 P に液体リザーバーの液面と流路端の高低差によって生ずる圧力を加える必要がある。また、平均流速 V で流れる直線流路の単位時間当たりの流量 Q は、流路断面の長辺の長さを W とすると

$$Q = C_b W Y V \quad (\text{式3})$$

となる。ここで C_b は流路断面の長辺と短辺の比によって決まる流量補正係数である（機械工学便覧 基礎編 A5 流体力学 p. A5-40 表16 日本機械学会編。昭和61年発行）。

【0033】さらに、各流路の合流点では、各流路から合流点に流れ込む液体の単位時間当たりの流量の総和を Q_{in} 、流れ出す液体の単位時間当たりの流量の総和を Q_{out} とすれば、オイラーの連続の式より

$$Q_{in} = Q_{out} \quad (\text{式4})$$

という関係式が得られる。これら式2、式3、式4を用いて、全流路と全合流点における関係式を連立方程式として解けば、各流路における流速が計算できる。この計算の中では流路断面が同一の直線流路を前提としているが、実際の流路では流路断面の大きさ、形や流れの方向が変化することによる圧力損失が生ずる。また、上述の流速計算では触れていないが、合流点においても圧力損失が生ずる。しかし、一般に、合流点における圧力損失は流路形状やレイノルズ数等によって決まる損失係数と流速の2乗の積を含む関数として表されるため、本送液によって得られる流速が非常に遅いことを考えると上述

の計算結果に殆ど影響を与えない。

【0034】また、流路内の拡散は以下のように表される（理化学辞典「拡散係数」岩波書店 1987年）。時間 t の間の粒子の変位 x の2乗と、拡散係数 D の間には、

$$x^2 = 2Dt \quad (\text{式5})$$

の関係が成り立つ。重力駆動力の発生源としては、基本的に、各液体リザーバーの液面差を用いる。この液面差を発生させる方法の一つとして、水平においたチップの、各液体リザーバー中の液面高さを利用する方法が採用できる。液面高さの調節は、リザーバーとしてチップに接着した管の高さ（長さ。液体を管全部に張り込む場合。）でも調節できるし、各リザーバーに入れる液体量を調節することによっても実現できる。本発明者らの検討では、実施例1に示したように、幅 $150\mu\text{m}$ 、深さ $30\mu\text{m}$ 程度のキャピラリーを有する、水平においたチップでは、 1.6mm 程度の各液体リザーバーの液面差で、 $100\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度の流速が実現できる。この流速は、流路の圧損と液体粘度などによって変化する。圧損が大きければ、もっと大きな液面差が必要となる。

【0035】実際的な応用を考えると、リザーバーの高さ（長さ）を変え、液体はリザーバー一杯に張り込む状態を、送液開始時点とするのが制御しやすい実施態様である。必要なリザーバーの長さ（高さ）は、上述の式2から4をもとに計算することができる。いずれにせよ、本発明において、各リザーバーに液体を張り込む際に、チップ外への液体の漏出を防ぐため、リザーバーの最上面には、液体は通さず気体のみ流通できる疎水性のベントが必要である。

【0036】重力駆動力の発生源として、チップ全体を傾けることも好ましい実施態様の一つである。上述した式に基づき、流路の幅方向の影響などを無視した簡単な場合について本発明者らが計算したところ、以下のような結果が得られた。検体、試薬液1、試薬液2の3成分系で、検体と試薬液1をまず合流・反応させ、ついで試薬液2を合流・反応させる流路（実施例1に記載の流路パターンはその一例）において、チップの傾け角度（廃液溜が一番下で、検体リザーバーと試薬液1リザーバーは同じ高さにあるように傾ける）を $5\sim 10$ 度と設定すると、溝幅と深さを $30\mu\text{m}$ 程度で、かつ、各試薬液及び検体リザーバーから次の合流点までの流路長を $2\sim 3\text{cm}$ 程度と設計すれば、流速が $100\sim 200\mu\text{m}/\text{sec}$ 程度になる。

【0037】しかも、傾け角度が 5 度あれば、リザーバー内の液量の違いによる液面高さ変化が $200\mu\text{m}$ 生じても、流速には影響が小さいことがわかった。傾け角度が 10 度になると、この程度の液量変化が流速に与える影響は、ほとんど無視してもよいレベルまで小さくなる。実際のリザーバー液面高さの経時変化は、 $30\mu\text{m}$

だったときに、直径 1.5mm のリザーバーでは約 $30\mu\text{m}$ になる。つまり、以上のことを総合すると、チップを 10 度程度傾けることにより、送液による経時的な液量変化の影響を実質上受けない重力送液が、実現されることを意味する。

【0038】実測した流速値は、実施例3に述べたように、図5の流路をもつチップでは以下ようになった。即ち、実施例3のチップは、溝深さはすべて $30\mu\text{m}$ であり、検体リザーバーおよび試薬1リザーバーから次の合流点までの流路（各々S、Aと呼ぶ。長さは 3cm ）幅が $80\mu\text{m}$ 、この合流点から試薬2液との合流点までの流路（S+Aとする。長さは 3cm ）幅が $125\mu\text{m}$ 、試薬2リザーバーから次の合流点までの流路（Bとする。長さは 6cm ）幅が $125\mu\text{m}$ 、3液が合流した流路（S+A+Bとする。長さは 3.5cm ）幅が $185\mu\text{m}$ であった。各リザーバーの位置関係は図5の通りである。このチップを廃液溜が下になるように、かつ、試薬1リザーバーと試薬2リザーバーとの水平に対し 10 度傾けた場合の流速は、Sで $88\mu\text{m}/\text{sec}$ 、Aで $55\mu\text{m}/\text{sec}$ 、Bで $74\mu\text{m}/\text{sec}$ 、S+Aで $80\mu\text{m}/\text{sec}$ 、S+A+Bで $80\mu\text{m}/\text{sec}$ であった。

【0039】この実測値は、式2から4に基づき、図9のモデル（図5の流路に対応）で計算した計算値（液密度は $1.04\text{g}/\text{cm}^3$ 、液粘度は $1.0\text{mPa}\cdot\text{s}$ とした）と良く一致する（図10）。つまり、流路長、幅、深さ、液体の粘度を加味した圧損、傾け角度等を設計すれば、所望する流速を実現することが可能となる。また、傾ける角度を自在に変化できる装置では、流速をゼロからのみならずマイナス（逆流）からプラスまで、最大限その流路を鉛直に立てた場合の流速まで制御することができる。さらに、流路パターンと傾け角度を組み合わせることにより、あたかも電車のスイッチバックのようにして、液をチップ中で自在に送ることも可能となる。

【0040】本発明において、移動させたい液体の、溝に対する濡れ性は重要である。濡れ性が悪いと、液の先端での表面張力のため、送液が滑らかに行かない上、流速の経時変化が起こる場合がある。それを避けるため、一旦全流路を濡らしておくことも好ましい実施態様の一つである。また、移動させたい液体に、適度の界面活性剤を添加することや、溝表面を親液体性に表面処理したり（多くの場合は水溶液の送液なので、親水性をあげる）、親液体性の素材を用いることも好ましい。

【0041】親水性向上のための表面処理の方法としては、溝表面にイオン性の官能基（カルボン酸、スルホン酸、4級アンモニウム塩など）を付加する処理が挙げられる。例えば、PMMA（ポリメチルメタアクリレート）の場合は、アルカリ処理で、溝表面のエステルを加水分解してカルボン酸に変化させたり、親水性のポリマーをグラフト重合させることなどである。また、リザー

るため、疎水性のベント膜（気体は通すが液体は通さない）をリザーバーとチップ外界との界面に貼ることなど、蒸散を最小限にすることが好ましい。

【0042】本発明に用いるベントは、カートリッジ内の液を通さず、気体特に空気を通す構造のもので有れば何でも良い。カートリッジ内の液が水溶液の場合、疎水性の有機ポリマーや無機素材からなる平板などに数 μm から1mm程度の小さな穴をあけた構造のものでも良い。この場合は、水の表面張力のために該小さな穴に液は入っていないが、気体は通ることになる。

【0043】本発明にかかるカップラーは、カートリッジと気密性が保たれる形で密着する必要がある。そのためカップラーのカートリッジとの接触面には、一般にOリングに用いられるような素材でできたパッキングを備えるか、カップラー自身が、かかる密着性のよい気密性の高い素材であることが必要である。また、Oリングのようなパッキングをカートリッジ側に接着してもよい。Oリングの素材としては一般に合成ゴム素材が使用されるが、たとえばエチレンプロピレンゴム、シリコンゴム、ニトリルゴム、クロロプレンゴム、イソプレンゴム、ブタジエンゴム、スチレンブタジエンゴム、ブチルゴム、エチレンプロピレンゴム、ウレタンゴムなどである。

【0044】本発明において、重力による送液を制御するためのカップラーは、液溜が大気に通じる部分（ベント膜部分など）を閉として、その液溜へ流入する、或いはその液溜から流出する液体の流れを止める機能を有する。このカップラーを開とすれば、その液溜からの液体の流出、液溜への流入を開始することができる。カップラーによる開閉は、開口部の無いカップラー自身が、チップ液溜に覆い被さって蓋をしたり、チップから離れることによって液溜と大気との流通を回復する方法でも実現できるし、カップラーの液溜との接続部から、マイクロバルブを介して大気につながる空気流路を設置し、そのバルブの開閉により、液溜と大気との流通を制御する方法も採用される。いずれも、閉鎖空間となる部分の空気体積は小さい方が、温度の影響を受けにくく、かつ開閉による送液の応答速度が速くなるので好ましい。また、開閉の切り替えの際に、ショック（閉鎖空間の空気体積変化）が小さいことが、送液の安定性の点から好ましい。

【0045】本発明において、検体と試薬液を混合、反応させて、分析する場合、各液体は、流しっぱなしで、反応が完了するだけの時間以上は流れた後の流路の一定の場所で、被験物質を検出・測定してもよいし、或いは、検体と試薬液を混合後、送液を上述のカップラーで停止させ、その停止液の反応が終了してからその場所で測定してもよい。酵素反応などでレートアッセイを行う際は、流しっぱなしの場合は、流路を順に下がる（または遡る）ことにより、反応の時間を、溝上の距離に置き

換えて測定する事ができる（一定流速の場合）。また、レートアッセイを、液を停止して行う場合は、同じ位置で経時変化を追えばよい。

【0046】以上は、検出の際の送液について述べたが、途中の混合・反応でも、流しっぱなしの場合と、2液以上を混合して一定の長さのプラグ（栓）を形成させた後に送液を停止し、そのプラグ内で反応を進行させる場合の両方が採用できる。すなわち、本発明の方法は、長時間連続的に行うことも可能であるが、必ずしも長時間連続的に行う必要はない。例えば、検出に10秒かかるとしたら、最低10秒間（通常はやや多めに20秒程度）、試薬1と試料との合流を行い、その3分後に試薬2との合流を同じく最低10秒間行えばよい。そして、それから10分後に検出を行う。つまり、本発明の方法は、流量制御を経時的にプログラマブルに行うことにより、最小限の試薬、試料量で、効率よく、一定体積の秤取をせずに、微量分析を行うことができる。

【0047】上述のような、分析に必要な、試薬液および検体がすべて混合されたプラグを形成させた後、流れを実質的に止めて測定すれば、より短い流路で分析することが可能となる。流れを実質的に止める方法としては、チップの傾斜を0度、すなわち水平にすることでも容易に達成されるが、前記のカップラーで各液体リザーバーや廃液溜を閉止することでも達成される。前者は、チップの傾斜度を迅速に、できれば自動で、変えられる装置があればよい。例えば、実施例4に記載の傾け台（図11）のようなもので、傾斜調節ねじ112、113をモーターなどで所定のねじ込み度に調節できるようにしてもよい。また、カップラーによる閉止法は、各液体リザーバーや廃液溜のベントの上から、大気に通じている部分を塞ぐような蓋をすることで容易に実現できる。

【0048】検出の際のみに液を止めるなら、廃液溜のみを閉止するだけでも十分である。また、2種以上の試薬液と検体とを順次混合していく際に、各混合段階で、流れを停止することも可能である。この場合は、当該液体リザーバー側を閉止する事が必要になる。流量比の検定については、試料の代わりに標準サンプルを流す事などにより、補正が容易に行える。或いは、製造ロット毎のチップ中の流路サイズを検定しておき、その補正値を用いても良い。

【0049】さらに本発明は、前記試料流路と前記試薬流路の流速が、実質的に同等になるように、試料及び試薬の液体リザーバー間の液面差と、前記試料流路及び前記試薬流路の流路抵抗が調節されていることを特徴とし、さらに、この流路抵抗の調節を、各流路の断面積と各流路の長さを変えることによって行うことを特徴とする分析装置を提供する。以下、この点について詳細に説明する。流路の合流によるチップ内の混合では、拡散が実質的な混合手段になる。本発明のような小さな溝で

は、液体中の各成分が、流れ方向に垂直（つまり、流路の断面の平面内）に拡散することが混合に重要である。例えば検体が1で、試薬液が1000の比率で混合する際には、合流部の圧力バランスがとれず、検体が一定流速で合流できない場合が生じることがあり、完全な混合のために要する時間はかなり大きく、そのため、流路が長くなる、という問題が生じる。よって、2液の混合流速比はできるだけ1に近い方が望ましく、実際の混合流速比としては、0.01から1000の範囲内、より好ましくは0.1～10の範囲である。さらに好ましい混合流速比は0.5から2の範囲内である。実質的に同等がさらにより好ましく、この場合は0.8から1.2の範囲内である。

【0050】この混合流速比は、各液体が発するリザーバーの位置（重力に対する高さ）と、流路の圧損とで決まる流量比に依存する。各リザーバーの高さが同じで、圧損も同じ場合には、溝の断面積比が混合流速比となる。さらに溝深さが同じであれば、溝幅の比率が混合流速比となる。本発明に於ける検出方法としては、光熱変換法、蛍光法、吸光度法、化学発光法などの光学的検出方法や、検出用電極を用いた電気化学的方法などが用いられる。

【0051】光学的検出方法においては、溝の幅、深さが1-1000 μm 程度のキャピラリーでは、チップ面の上下（角度は必ずしもチップ面に垂直である必要はない）方向での、つまり、液体の流れと垂直または斜め方向での、光路長は溝の深さ程度しか取れないので、光熱変換法や蛍光法、化学発光法などが適している。吸光度法は一般には感度は低いが、十分高濃度のものは、溝の深さ程度の光路長（チップ面に垂直方向の光路など）でも検出可能であるし、また、流れ方向に光路をとる（チップ面内での光路）ことにより1-10mmの光路長を確保できるので、低濃度物質でも検出可能である。電気化学的方法としては、グルコース電極などの物質特異的な酸化還元電位を利用した電極が用いられる。

【0052】先述したように、溝の幅、深さが1-1000 μm 程度のキャピラリーでは、チップ面の上下（角度は必ずしもチップ面に垂直である必要はない）方向での、つまり、液体の流れと垂直または斜め方向での、光路長は溝の深さ程度までしか取れないが、光熱変換法とりわけ熱レンズ法を用いれば、この程度の光路長で十分高感度で対象物質の検出が可能である。光熱変換法は、光路長を長く取るための複雑な流路構造を作る必要のない、即ち安価なチップで、また、半導体レーザーとフォトダイオードの組み合わせなど安価で簡単な光学系の検出装置で検出が可能であり、好ましい実施態様の一つである。

【0053】本発明に係るチップは一对の板状部材から成り、少なくとも一方の板状部材は表面に液体が流れる溝を有する平板である、該平板の該流路を内側にして張り合わせてつくられるものであり、シリコンやガラス等

の無機材料や有機ポリマーで作製することができる。シリコンやガラスの場合は、ガラス、石英もしくはSi基板にエッチング保護膜（Cr等）を真空蒸着等の方法で数1000オングストローム製膜し、その上にパターンレジストをスピナーを用いて塗布する。その後、フォトリソ用マスクを用いて、紫外光にてレジストを露光、続いて現像（未硬化部分を溶剤で除去）し所望の形状にパターンニングする。次に、パターンニングされたレジストをエッチングマスクとして、エッチング保護膜をフェリシアン化カリウム水溶液等で溶解除去しパターンニングする。

【0054】続いて、パターンニングされたレジストおよびエッチング保護膜をマスクとして、基板を例えば弗酸水溶液にてエッチングして溝を形成する。その後、レジストおよび保護膜をエッチング除去する。また、上記基板とは別に、超音波加工等の方法で貫通孔を開けたガラス等の基板を準備する。最後に、溝加工された基板と貫通孔を開けられた基板を溝を内側にして合わせ、例えば、真空炉中にて加熱（ガラス基板同士の場合には、600度程度に数時間加熱）した後、自然冷却することで融着し作ることができる。ただし、シリコンは光学的な検出には適さない。

【0055】本発明においては、平板状部材の表面に備えられた溝の断面形状は、四角形、三角形等の多角形の形状、半円形、半楕円形等、特に制限されない。また、チップが何種類かの異なった形状の溝を組み合わせる流路を表面に有していてもよい。溝の上面（開放面）の幅は、溝の下面（底）の幅と同じであるか又は広くてもよい。なお、後述の光熱変換法に基づく検出手段をより簡便に精度良く行うためには、溝断面形状が四角形であることが望ましい。

【0056】この溝は、あまり小さすぎると、微粒子により流れが乱される原因となる。また、あまり大きすぎると、多くの流路を1つの平板状部材の表面に作る際に、平板状部材の面積を大きくしなければならないだけでなく、拡散による混合を行う際の拡散距離の点で問題が発生する。そのため、溝の幅が1～1000 μm 、深さが0.1～1000 μm 、断面積が1～100000 μm^2 であることが好ましい。より好ましくは、幅が2～500 μm 、深さが1～500 μm 、断面積が2～250000 μm^2 、更に好ましくは、幅が2～200 μm 、深さが1～200 μm 、断面積が2～40000 μm^2 である。

【0057】本発明の平板状部材は、その表面に有する溝の寸法精度は特に問わない。しかし、極微量成分の分析や定量分析等を行う上では、寸法精度は優れていることが好ましい。すなわち、溝の寸法精度は、操作の精度および個々の分析装置間の再現性を得るため、金型の凸形状（成形により転写され、平板状部材では溝が形成される）に対し、幅および深さにおいては $\pm 5\%$ 以内、断

面積においては±7%以内の寸法精度(寸法転写精度)を有することが好ましい。また、高精度の定量分析を行うためには、幅および深さが±2%以内、断面積が±4%以内の寸法精度を有することが更に好ましい。

【0058】平板部材が有機ポリマー製の場合は、光学的検出を行う場合は検出に用いられる波長の光に対して透明性を有する樹脂が使用できる。例えば光熱変換法による検出の場合、ASTM D1003で測定される樹脂の光線透過率において使用できる励起及び検出のレーザーの波長を考慮すると400nm~800nm好ましくは600nm~800nmの波長範囲、吸光度法による検出の場合、 H_2O_2 -POD系を例にとると500nmから800nmの波長範囲、化学発光法による検出の場合、400nmから600nmの波長範囲、蛍光法による検出の場合、480nmから700nmの波長範囲でそれぞれ光の透過率が80%以上好ましくは90%以上のものが良好に使用できる。

【0059】上記の光線透過率は、チップ表面での反射率および有機ポリマー基材そのものによる吸収率の総和を、100%から減じた値である。チップ表面などで散乱される光は有機ポリマーに対しては何の効果も発揮しないのに対し、有機ポリマー基材によって吸収される光は、有機ポリマーに対しても熱を発生させる効果を持つ。よって、光が有機ポリマーを通過する際に熱レンズのような効果が生じ、熱レンズ検出法による出力に対しバックグラウンドとなるため、測定の誤差となる。そのため、実際のチップ作成に先立って有機ポリマー材の評価を行ない、実際の熱レンズ検出法に影響を及ぼさない吸収率の範囲を決定する必要がある。

【0060】吸光度で検出する場合は、有機ポリマーによって10%程度吸収されたとしても、全体の光量を90%に低下させるにすぎず、検出感度にはさほど影響しない。しかしながら、光熱変換検出法の場合は、10%以下の吸収であっても、樹脂中に形成される熱レンズのため測定に大きな影響を与える。励起光がチップを通過する全光路で、該有機ポリマーによって吸収される割合は5%以下であることが、熱レンズ検出法では重要である。しかし、測定対象物の濃度が薄く、かつキャピラリーが細い(溝が浅い)といった、測定に高感度を要求される場合には、わずかな吸収であっても、キャピラリー中の物質測定に悪影響を与えるバックグラウンドの原因となる。1cmの光路長の場合の吸光度が0.1程度の測定を、本発明の分析装置で行うには、チップを形成する有機ポリマーによる光の吸収が1%以下、より好ましくは0.2%以下であることが望ましい。検出光についても、吸収があることにより自らの光路に変化をきたす結果を招くため、同様に、チップを通過する全光路で該有機ポリマーによって吸収される割合を数%以下にすることが望ましい。また平板に溝加工する際の加工性も重要な要素である。加工性の面から良好に使用できるのは、

一般の溶融加工可能な熱可塑性樹脂やUV硬化によって得られた樹脂が上げられる。

【0061】さらに良好に使用できるのは、表面に溝を有する平板を大量に且つ安価に加工成形出来る溶融加工可能な熱可塑性樹脂であり、この中でも非結晶性熱可塑性樹脂、非結晶性樹脂が主成分の熱可塑性ポリマーアロイ、あるいは結晶化度が低い一部の結晶性熱可塑性樹脂である。以上の光の透過性と加工性を満足し特に良好に使用できるのは、具体的には、ポリスチレン、スチレン-アクリロニトリル共重合体等のスチレン系樹脂、ポリメチルメタクリレート、メチルメタクリレート-スチレン共重合体等のメタクリル樹脂、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリエーテルイミド、ポリアリレート、ポリメチルペンテン等である。

1, 3-シクロヘキサジエン系重合体も好適に用いられる。

【0062】ホモポリマーとして使用することも可能であるが、共重合体として用いる場合は、1, 3-ブタジエン、イソプレン、1, 3-ペンタジエン、1, 3-ヘキサジエン等の鎖状共役ジエン系モノマー、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、1, 3-ジメチルスチレン、ビニルナフタレン、ビニルスチレン等のビニル芳香族系モノマー、メタクリル酸メチル、アクリル酸メチル、アクリロニトリル、メチルビニルケトン、 α -シアノアクリル酸メチル等の極性ビニルモノマー若しくはエチレンオキシド、プロピレンオキシド、環状ラクトン、環状ラクタム、環状シロキサン等の極性モノマー、またはエチレン、 α -オレフィン系モノマーとの共重合体が挙げられる。この場合の共重合比は重量比で1, 3-シクロヘキサジエンモノマー/コモノマー=75/25~100/0が好ましい。光透過性の高いシクロヘキサジエン系ポリマーについては特願平9-277045号中に詳細に記述されている。該ポリマーは、素材として、200nm以上の波長の吸収はほとんどなく、また、非晶性のC-Hポリマーなので、短波長の光源による検出も可能である。

【0063】本発明の表面に液体が流れる微細な溝を有する有機ポリマー製の平板は、板状部材からの切削加工やレーザー等によるエッチング加工、型内でのモノマーやマクロモノマーのUV硬化や熱硬化、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工等の方法により成形できる。良好に使用できる成形加工法は、表面に溝を有する平板を大量に且つ安価に成形加工出来ることから、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工である。さらに良好に使用できるのは、金型を用いた熱可塑性樹脂の射出成形法及び/又は圧縮成形法、エンボス成形法である。

【0064】特に、樹脂の金型キャビティへの充填工程中に、金型に接する樹脂表面の固化温度を低下させつつ射出成形する射出成形法(特願平10-46665号。日本国特許公開公報 平成10年第128783号、日

本国特許公開公報 平成10年第50719号等)は、生産性良く成形精度の高い微細な溝を有する有機ポリマー製の平板を作ることが出来る、この射出成形方法の具体例としては、キャビティー内に炭酸ガスを満たしておき射出成形する方法が上げられる。この場合の炭酸ガスの圧力は、10MPa以下が好ましい。微細な溝角への炭酸ガス残留の影響を小さくするため、0.3から2MPaがさらに好ましい。

【0065】また、成形直前に高周波誘導加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法(特公昭62-58287号、米国特許第4439492等に記載)や成形直前に輻射加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法(成形加工シンポジウム'95, 241<1995>、成形加工'96, 69<1996>、合成樹脂, 42巻(1), 48<1992>等に記載)などの金型表面を加熱して成形する射出成形方法も、金型温度を低く設定し、高周波誘導加熱やハロゲンランプ等の熱源により成形直前に金型表面だけを選択的に加熱して、型表面転写性と成形サイクルの両立をはかれる成形方法であり、本発明の検出装置のチップの製造に好ましい成形方法である。

【0066】本発明の検出装置のチップを、特開平6-283830号の回路基板を製造する方法に基づいて製造することも可能である。ガラス基板を使用する場合、ガラス基板上にレジストパターンを形成してサンド・ブラスト法でガラス基板を加工する方法があげられる。厚いレジストで飛来する粒子の方向が垂直方向にそろうため、通常の薄いレジストに比べてシャープな加工が可能で、高アスペクト比の溝を作る事が出来る。また、ガラスや樹脂基板上に感光性レジストを塗布し、溝以外の部分を露光した後、未硬化部分を除去して、溝の形状のレジストパターンを基板上に形成する手法も可能である。

【0067】チップ成形用の金型は、鉄又は鉄を主成分とする鋼材、アルミニウム、又はアルミニウムを主成分とする合金、亜鉛合金、ベリリウム-銅合金等の一般に合成樹脂の成形に使用されている金属金型が良好に使用できる。金型作製方法の1つの例を挙げると、まず、金属、プラスチック、シリコン又はガラス等の材料からの切削加工やエッチング加工、又は紫外線硬化樹脂のフォトリソグラフィ加工等の方法により、目的とする微細な溝を有する母型を1つ作成し、この母型からニッケル等の電気化学的鑄造法により作製される。また前述の特開平6-283830号のレジストパターンを形成する方法を用いて金型を作ることにも可能である。金属基板にレジストパターンを形成した後、レジストの無い部分を金属メッキで埋め、レジストを除去して、基板表面に微細なパターンを施した、金属板を形成する。この金属板を金型にして、樹脂や焼結ガラスなどの加工を行う事が可能である。

【0068】また、本発明の表面に液体が流れる微細な

溝を有する有機ポリマー製の平板を有するチップは、溝内面を、ポリエチレングリコールのグラフト重合などで蛋白吸着防止処理や親水性処理などをしてもよい。本発明に係るチップは、上記の平板の少なくとも1枚を含む2枚の板状部材を、流路を内側にして、超音波融着、熱融着、ホットメルト接着剤やUV接着剤等の接着剤による接着、粘着剤による粘着、直接又は薄い弾性シート、両面テープ等を介しての圧接等の方法で張り合わせて作られる。溝を有していない板状部材(以降被せ平板と呼ぶ)の材料は上記溝を有する平板の作製に用いられる材料の中から選ぶことができる。同じ材料でもよいし、異なる材料であってもよい。厚みは検出の障害になることが無ければ、特に限定されるものではないが、0.05～数mm程度が好ましい。

【0069】また、本発明のキャピラリー装置の構造は、加工生産性の点からは、少なくとも一方の板状部材は表面に液体が流れる溝を有する平板と、他の平板を、該平板状装置の溝を内側にして張り合わせてつくられる一対の板状部材からなる構造をとることが好ましいが、貫通溝をもつ平板を、他の平板2枚で挟んで溝を形成させて3枚構成とすることも可能である。この被せ平板には、空気抜きのための小穴や、液の導入、導出貫通孔があいていてもよい。また、溝含有平板側に液の導入、導出貫通孔があいていてもよい。導入、導出貫通孔には液だめ(試薬、検体、緩衝液、廃液などをいれる)のための円筒を接着してもよい。この円筒の大きさは特に限定するものではないが、高さ1～数mm、径1～数mm程度が好ましい。溝含有平板や被せ平板が数mm程度の厚みを有する場合、該貫通孔が液だめを兼ねることもできる。

【0070】また、先述したように、試薬液溜には、空気を通すが水溶液は通さない疎水性のベントが装着されていることが好ましい。これは、試薬リザーバー部分に乾燥固着された試薬を溶解液で溶解する際(水溶液でリザーバーが満たされるときに、液が溢れずかつ残留空気がぬけていく)にも、また、重力で液送りする際(空気が入ってこないと落ちていかない)にも望ましい構造である。ベントは、カートリッジ内の液を通さず、気体特に空気を通す構造のもので有れば何でも良い。カートリッジ内の液が水溶液の場合、疎水性の有機ポリマーや無機素材からなる平板などに数μmから1mm程度の小さな穴をあけた構造のものでも良い。この場合は、水の表面張力のために該小さな穴に液は入っていないが、気体は通ることになる。

【0071】疎水性有機ポリマーとしては、臨界面張力が20℃で約40ダイン/cm以下であることが好ましく、例えばポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、シリコン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアリレート、ゼ

リメチルペンテン、1, 3-シクロヘキサジエン系重合体などが挙げられる。逆に、カートリッジ内の液が疎水性の有機溶媒の場合は、親水性の非常に高い素材からなる平板などに小さな穴をあけた構造のものがベントとして機能することになる。

【0072】医療診断における分析では、カートリッジ内の液が基本的には水を主成分とするので、本発明に用いるベントは、製造上の点、および漏れの恐れがきわめて小さい点からも、疎水性の膜を用いることが好ましい。疎水性の膜材料としては上述の疎水性平板材料と同様に、臨界面張力が20℃で約40ダイン/cm以下であることが好ましく、例えばポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、シリコン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリカーボネート、ポリスルホン、セルロースアセテートなどが挙げられるが、特に、GOT/GPTやコレステロール量などの生化学分析においては、一般には血漿蛋白の吸着防止などのために、試薬に界面活性剤を添加することが多いので、その場合は、より疎水性の強い膜が必要となる。

【0073】通常は、セルロースアセテート膜のようなものでも機能する場合もあるが、界面活性剤が添加された試薬液の場合は、PTFEやシリコン、ポリエチレン等の疎水性の強い膜の方が液のしみ出しを防ぐ耐水圧が大きくて好ましい。試薬の乾燥固着の工程を考慮すると、界面活性剤入りの試薬に対して、形状がより安定なPTFE膜など、疎水性の高いベント膜がさらに好ましい。耐水圧は大きいほど高い圧力で液送りできるため大きいほど好ましいが、本発明の生化学分析用カートリッジに使用できるベント膜の耐水圧は100 g/cm²以上、好ましくは1000 g/cm²以上、さらに好ましくは3000 g/cm²以上である。膜の平均孔径は約5 μmから0.1 μmのものが使用できるが、孔径が小さいほど耐水圧が高く、透過空気量が僅かであることを考慮すると、0.1 μmが好ましい。膜厚は100乃至300 μmのものが好ましい。

【0074】以上述べてきた疎水ベントを備えた試薬リザーバーに、試薬を乾燥固着して、市場に流通させ、測定直前に、チップに装着された試薬溶解液を各試薬リザーバーに張り込んで、即時溶解して液送りに備える、という態様が、POCの簡便性から見て、好ましい。電極検出の場合に、電極および配線を導電性インクで印刷する場合は、金、銀、銅、ニッケル、カーボンブラック、グラファイト等の微粒子を含有したインクを用いて、例えばスクリーン印刷で電極を形成することができる。スクリーン印刷で貫通孔の内壁を印刷するには、最近の多層化プリント基板の各層の導通のために行われるスクリーン印刷機による、導電性インクのスルーホール印刷技術を応用することができる。スルーホール印刷は、印刷する試料を試料台の上に、試料の貫通孔と試料台の吸引孔との位置を合わせて設置し、試料に印刷しながらまたは

印刷した後、貫通孔周辺に溜まったインクを吸引して、貫通孔の内壁をつたわらせて印刷するものである。

【0075】真空蒸着やスパッタ製膜では、貫通孔の内壁全面または一部のいずれの場合も、深さは平板状部材の溝の近くまで達するように、金や白金を印刷あるいは蒸着する。この際、貫通孔をテーパ状にしておけば平板状部材を傾けることなく貫通孔の内壁に電極を形成することができる。なお、熱レンズ検出法で検出できる対象物は、励起光を吸収するものであれば何でも良いが、試料中の他の物質、特に励起光を吸収するものや、検出光を吸収または検出光の波長に対して蛍光などを持つ物質とは、光熱変換が行われる前に分離しておくことが必要である。励起光を吸収する度合いは、モル吸光係数が1,000から100,000程度あることが感度の点で望ましい。

【0076】励起光を吸収しない、あるいは、わずしか吸収しない検出対象物質は、検出対象物質を基質とする酵素を用いた反応を組み合わせて、励起光を吸収する物質(可視光の場合は色素)に変換して測定する。あるいは、検出物質対象に対する抗体を用いて、励起光を吸収する物質でその抗体または2次抗体を標識して、直接若しくは酵素反応の結果生じる励起光を吸収する物質を測定する。例えば、検出対象物質として生物学的材料を検出する場合、検出対象物質を基質とする酵素を用いた反応を組み合わせて、最終的に以下の物質に変換することなども可能である(Aoyama, N. 臨床検査, 41:1014(1997))。

【0077】すなわち、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン(EMAE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-スクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAPS)、N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HSDA)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAOS)、N,N-ビス(4-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MADB)、N,N-ビス(4-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DADB)等と4-アミノアンチピリンの縮合体である励起光を吸収する物質、若しくはビス{4-[N-3'-スルホ-n-プロピル]-N-n-エチル}アミノ-2, 6-ジメチルフェニル}メタン(Bis-MAPS-C2)、ビス{4-[N-3'-スルホ-n-プロピル]

ル]-N-n-プロピル]アミノ- 2, 6- ジメチルフェニル} メタン(Bis-MAPS-C 3)、ビス {4-[N-3'-スルホ-n-プロピル]-N-n-ブチル} アミノ- 2, 6- ジメチルフェニル} メタン(Bis-MAPS-C 4) 等の励起光を吸収する物質への変換である。

【0078】これら反応をチップ内で行う際に、試薬溶液はチップの外から、チューブや針を用いて供給してもよい。あるいは、チップ内にビニル袋（材質はポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、塩化ビニルなどで、試薬と相互作用しないものならよい）等の小さい容器に封入した試薬溶液をセットしておき、チップ内の針をビニル袋に外から押しつけるなどして該袋を破って、チップ内の試薬溜に試薬溶液を移液してもよい。さらには、試薬を乾燥固体としてチップ内に封入しておき、チップ内もしくは外の水、または緩衝液溜からの水もしくは緩衝液を、試薬固体封入場所に所定容積導入して、所定の濃度の試薬とする方法などがある。

【0079】また、試料はそのままチップに入れてもよい。また、河川の汚濁分析や尿分析などでは、前処理として分子量で分画可能な膜フィルターなどを用いて濃縮してもよい。また、チップにフィルターを設け、試料中のゴミや、血球などを除去してからキャピラリーに導いてもよい。本発明のチップのキャピラリーには、一定量のサンプリングを主な目的とした流路部分、試薬や試料の混合を主な目的とした流路部分、試薬や試料の移送を主な目的とした流路部分など、部分毎に異なった操作を主な目的とした流路部分を作ることができる。また、本発明のチップは、流路が、1つの操作を主な目的とした流路部分のみからなっているてもよいが、複数の各々異なった操作を主な目的とした流路部分を組み合わせられているてもよい。このことにより、単なる定性分析ではなく、定量分析や反応などを伴うような高度な分析が可能な装置とすることができる。

【0080】試料や試薬の混合や希釈を主な目的とした流路部分の形状は、サンプリング（分取）と組み合わせで行う場合には、流路途中に幅が広い形状および／または深さの深い形状（この部分は、mmオーダーからcmオーダーのサイズとすることが好ましいこともある）などがあげられる。なお、一旦、送液を止め拡散により液体を均一化したり、機械的攪拌により液体を均一化する等の均一化工程を取ることが好ましい。特に、機械的に攪拌できる構造（攪拌バーを入れておき、磁力により攪拌するなど）は、均一化に時間を必要とせず好ましい。

【0081】また、流路構造によっては、試料や試薬の混合や希釈を主な目的とした流路の形状として、1本の流路に他の流路を合流させた形状や、1本の流路に複数本の流路を一カ所で合流させた形状などを挙げることができる。1本の流路に他の流路または複数の流路を合流させ一本の流路とすることにより、流路形状のみで、混合操作や希釈操作を行うことができる。また、この時、

各々の流量を変えることにより、異なった比率での混合や希釈も可能である。この場合には、合流部分に邪魔板構造を設けたり、合流部の後に拡散により液体を均一化する流路を設けることが望ましい。液体を均一化する流路部分の形状としては、直線状の形状、蛇行状や渦巻き状に曲げられた形状などの形状が挙げられる。加えて、混合した液体が所定の反応を行うのに必要かつ十分な時間を確保する必要があるが、混合後得られる所定の流速に応じて、合流点から次の合流点もしくは検出部に至るまでの流路の距離を所要の距離とすることで、別途反応時間を計測する手段を用いることなく必要な反応が行える。

【0082】さらに、上記とは逆に、1本の流路が多数本に別れる流路（流路を分岐）とすることにより、分流を行うことも可能である。本発明に係る分析装置のチップにおいては、試料は適当な手段により制御されて、希釈や他の試薬との反応が行なわれる。また、これらの液体の合流などの操作は、通常タイミングも精度良く制御しなければならない。これらの操作を精度良く、簡便に、かつ外部タイマーなど余分な装置を用いることなく行うことを、それぞれの液体を所定の流量比率で混合、反応させることと、所定の流速で流れる合流後の液体に、混合、反応に必要な時間流動するのに必要かつ十分な長さのキャピラリーを与えることとで実現できる。本発明で言う流量とは、キャピラリー中を一定時間内に移動する液体の体積を意味する。

【0083】バッチ反応での混合比は、流量比に置き換えることができる。流量比は、溝の圧損を調整することで制御でき、溝の断面積と長さを変えることが、容易に設計できるので好ましい。溝があまり細いと、貼合わせの際に接着剤により溝がつぶれたり、小さな不溶物や気泡により送液が乱されるので好ましくない。また、溝の長さも、チップの面積から自ずと限界はある。前述したように、チップ中における混合は、混合すべき2液ができるだけ1:1の流量比で合流することが好ましい。

1:1から離れる場合も、できるだけこの比に近づけるよう試薬濃度を調整することが好ましい。

【0084】上述の、特に生化学検査項目のように、試料と試薬とを反応後、分離の必要なく検出ができる場合は、分離のために一定量秤取することなく混合から反応、検出まで一貫した流路で連続的に処理が可能である。一般に、例えば吸収波長の関係で検出すべき成分が他の夾雑物の妨害なく検出できる場合や、試料中の水酸基を酸化して生成したカルボニル基を分光光度計で検出するなど、検出する物質が変化する場合は、分離することなく、所定の流量比での混合、反応から検出まで一貫した流路で処理することができる。

【0085】以上説明したこの実施形態の分析装置を用いれば、医療現場でのベッドサイド診断や、外来患者に受診当日にその日の検査結果を知らせることが可能とな

るため、その結果に基づく治療薬、治療方法の選択を迅速に行うことができる。また、河川の汚濁、廃棄物中の有害物質の定量定性分析等も、汚染現場で容易に行うことができる。さらには、輸入食品の通関時の汚染検査や、調理現場での即時的な分析も可能となる。

【0086】検出対象物質は、化学物質、蛋白、核酸など特に問わないが、環境汚染化学物質、血液・髄液・唾液や尿中に含まれる生体成分、臓器・組織・粘膜由来の生体成分、感染源となる菌やウイルスなどの蛋白、DNA、RNA、アレルゲン、種々の抗原等が対象となりうる。以下に、実施例を用いて本発明の効果をさらに具体的に説明する。

【0087】

【実施例1】本発明の一実施例として、血清中のトータルコレステロールの定量測定を、検体とトータルコレステロール検出キット（商品名 コレステロールE-HAテストワコー（和光純薬（株）製））とを用い、三種類の液体（二つの試薬と一つの検体）の流量制御をしながら行った例を示す。送液は、各液体リザーバーの液量を調節することによる重力送液で行った。

（キャピラリー装置の作成）キャピラリー装置の表面に溝を有する平板は射出成形により成形した。射出成形に使用した樹脂は、メタクリル樹脂（旭化成工業製デルベット 80NH）である。ガスとしては純度99%以上の二酸化炭素を使用した。成形機は住友重機械工業製SG50を使用した。

【0088】射出成形の方法としては、樹脂の金型キャビティへの充填工程中に、炭酸ガスを存在させ、金型に接する樹脂表面の固化温度を低下させつつ射出成形する射出成形法（日本国特許公開公報 平成10年第128783号、日本国特許公開公報 平成10年第50719号）を用いた。金型表面は、入れ子あるいはスタンパーで形成され、該入れ子あるいはスタンパーの表面は微細な形状に加工されている。スタンパーは、次のようにして作成した。即ち、射出成形した際に図1に示した溝が形成できるパターンをマスクを、シリコンウェハー上に50 μ mの厚みでコートしたDFRに乗せて露光し、シリコン上にDFRのパターンを形成した。

【0089】このシリコン/DFRに対してニッケル電鍍を行い、さらに、電鍍品の厚みや幅、長さを、金型にはまるように微調整（ヤスリで研磨する）してスタンパーを得た。金型表面状態の転写性は、光学顕微鏡による観察、レーザー顕微鏡による形状測定で評価する。また、成形品も、光学顕微鏡による観察、切断断面の溝形状の光学顕微鏡や電子顕微鏡での観察、レーザー顕微鏡による形状測定等で観察する。

【0090】金型キャビティの表面温度が80℃の金型内に、二酸化炭素を1MPaの圧力に満たし、次いで樹脂温度240℃のメタクリル樹脂を射出し、シリンダ内樹脂圧力80MPaで10秒間保圧し、20秒間冷却し

た後成形品を取り出した。金型に満たした二酸化炭素は、樹脂充填完了と同時に大気中に開放して、表面に溝を有する平板を成形した。成形された平板は縦120mm、横80mm、厚み5mmで図1に示す様なパターンに溝が形成されている。液だめのための直径1.5mmの貫通孔4カ所を、ドリルであけた。

【0091】液だめ1は検体用、液溜2は試薬1用、液溜3は試薬2用、液溜4は廃棄用である。5は熱レンズ信号を検出した位置を示す。溝の深さはすべて50 μ m、溝の幅と長さは、溝11：幅150 μ mで長さ5mm、溝12：幅150 μ mで長さ5mm、溝13：幅150 μ mで長さ6mm、溝14：幅300 μ mで長さ9mm、溝15（試薬2の合流点から熱レンズ検出位置まで）：幅450 μ mで長さ9mm、溝16：幅450 μ mで長さ9mmである。この成形品に、溝を内側として、300 μ m厚みのメタクリル樹脂シートを、メタアクリレートモノマーで溶解したアクリル系光硬化性接着剤で貼合わせた。

【0092】貼合わせ後のチップの貫通孔に、マイクロピペットの200 μ l用チップを切って作成した円筒形の外付け液溜を接着した。外付け液溜の大きさは、内径3mm、高さ10mmであった。

（光熱変換検出系の構成）使用した光熱変換原理に基づく検出系を図2に示す。顕微鏡にはステージ上での試料の取り扱いの容易さを勘案し倒立型顕微鏡（IX70、Olympus製）を使用した。これは別に落射型の顕微鏡であっても構わない。この顕微鏡は、顕微鏡外の光学系で同軸にされたレーザー光を導入できるよう改造を加えてある。レーザーは、励起用にはHe-Neレーザー（633nm、10mW、エドモントサイエンティフィック製）を、検出用のプローブ光には半導体レーザー780nm（日本科学エンジニアリング社LDT7830）を使用した。ミラー、ビームエクspander等の光学系はメスグリオ社製品で統一した。

【0093】これらレーザーは使用する試薬、生成する反応物の吸収スペクトルにより適当な周波数のものを利用すればよい。またレーザーはガス、固体、半導体などの種類を選ばない。励起用のレーザー光はライトチョッパーにより変調された後、ダイクロイックミラーにより検出用レーザーと同軸にされ、顕微鏡に導かれ試料に照射される。測定試料を照射した後、同軸にされたレーザー光の内、励起光のみを選択的にフィルターにより除去しフォトセンサーに導く。レーザー光受光部分の素子には、取り扱いの簡便性を考えファイバー付きのフォトセンサーアンプ（C6386、浜松ホトニクス社製）を使用した。このフォトセンサー受光部はピンホールを持つカバーで覆われている。フォトセンサーおよびセンサーアンプからの出力は低雑音プリアンプ（LI-75A、エヌエフ回路ブロック社製）で増幅した後、ロックインアンプに導かれ信号処理が行われる。

【0094】本検出系を用いた検出の手順は以下である。溝パターンを形成してある平板チップを倒立顕微鏡のステージ上に置く。対物レンズの焦点合わせは励起用レーザーを使用しモニター画面を参照しつつ溝パターンの上辺、下辺の位置での焦点合わせを実施したのちその中間点をもって溝の中心位置とした。焦点合わせを実施した後、上記に詳述したような検体と検出用試薬との反応を行わせ、反応生成物を含む溶液を検出部分に導く。励起用レーザーはライトチョッパーにより116Hzに変調され、溝パターン内反応生成物を励起し発熱過程を生じさせる。このライトチョッパーによる変調の周波数はSN比等の影響により変更することも有り得る。この発熱過程により発生した熱レンズにより検出用レーザーの焦点位置がずれ、それによりピンホールを通してフォトセンサーの受光量が発熱量に応じ変化する。測定時、試料の流れは停止させても、流した状態でも構わないが、本実施例では流している状態で測定を行った。フォトセンサーからの信号はロックインアンプにより処理されるがここでは時定数として1秒を用い、ライトチョッパーと同じ周波数116Hzの信号のみ選択的に出力として用いた。ロックインアンプの出力電圧は励起光により励起される反応生成物濃度に比例するため反応生成物の定量化が可能である。

【0095】＜血清中のトータルコレステロールの定量＞

（検出キットの調製）HAテストワコーコレステロールE-HAテストワコー（和光純薬工業（株）社）を用い、付属のプロトコルに従った。ただし、標準血清を、検出キット付属の試薬1溶解液で希釈したため、この希釈血清と合流する試薬1液の濃度は、キット付属のプロトコルよりも高くして、希釈血清（検体）と試薬1液が合流混合時に、（希釈してない）血清と試薬1とその溶解液との混合比がキット所定の比率になるように調整した。具体的には、試薬1を、キット所定量の半分である23mLの試薬1溶解液で溶解した。また、使用するチップ流路の流量比を考慮して、試薬2はキット所定の0.6倍濃度とするために、試薬2を、24.242mLの試薬2溶解液で溶解した。

（検体：標準血清の調製）協和メディックス社脂質測定用標準血清の調製法を一部改変して調製した。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を付属の標準血清溶解液851 μ Lを用い溶解し、計算値でトータルコレステロールが800mg/dlになるように調製し、ストック溶液とした。次にストック溶液を付属の標準血清溶解液で希釈し、計算値で400mg/dl及び200mg/dlのトータルコレステロールを含む溶液を調製した。この試料を、検出キット付属の試薬1用溶解液で35.5倍に希釈したものを検体とした。

【0096】（トータルコレステロールの検出）熱レンズ測定の顕微鏡の観察ステージを、シートヒーターと温

度コントローラーと熱電対（チップの下面と観察ステージとの間に温度計測部を挟み込んだ）により、溝側のチップ表面の温度を37℃とした。液だめ4に試薬1溶解液を約75 μ L滴下し、キャピラリー全体が試薬1溶解液で満たされた後、液だめ2に試薬1を約75 μ L、液だめ3に試薬2を約75 μ L、液だめ1に検体を約75 μ L滴下した。各液には、流れ確認用の直径0.5 μ mのラテックスビーズ（大塚電子（株）社製、平板試料用セルモニター粒子）懸濁液を少量（0.1体積%）添加した。まず、顕微鏡で各流路の流れを覗きながら、流れがほぼ止まるように各試薬溜（リザーバー）の液量をピペットで微調整した。ついで液溜4から40 μ Lの液体を抜き、ついで液溜3から2～3 μ Lの液体を抜き出した。このとき、液溜1と2の間の液面差はゼロ、液溜1、2と4との液面差は1.6mm、液溜3と液溜4との液面差は0.3～0.4mmとなる。

【0097】この状態での流速は、流路11で約70 μ m/秒、流路12で約70 μ m/秒、流路14で約70 μ m/秒、流路13で約70 μ m/秒、流路15でも約70 μ m/秒であった。この流量比は最低約10分間、安定していた。この流速で、検体と試薬1との反応時間は128秒、さらに、検出までの試薬2との反応時間は128秒となり、あらかじめ測定しておいた最少反応時間である各2分を上回って、反応が完結できた。本実施例の結果は、図3に示したが、測定した範囲で直線性の高い用量依存性を示した。流路容積の補正が必要な場合はキャピラリー装置内の検体の液だめの近くに標準サンプル用の液だめを準備しておき、検体の測定前または後に標準サンプルを試薬1、2とともに送液・反応し検出して補正する。

【0098】

【実施例2】＜液量調整による γ -GTP＞該発明の一実施例として、レート法で測定する血清中の γ -GTPの定量を、希釈した標準血清と γ -GTP活性測定キット（ γ -GTPカインス（カインス（株）社製）の試薬1（基質）及び試薬2（発色及び反応停止剤）の2つの反応試薬の計3溶液での流量比制御で行った例を示す。送液は、リザーバーの液量調節による液面差を利用したヘッド差によって行った。

（試薬の調整）試薬1は、キット所定量の半分の50mLの緩衝液（キット付属）で溶解した。また、試薬2は、キット付属の液体試薬をそのまま用いた。

【0099】（検体の調整）管理血清として、スイトロールA「ニッスイ」（日水製薬（株）社）を、以下のようにして用いた。すなわち、 γ -GTP濃度が566IU/Lになるよう、スイトロールAを1174 μ Lの精製水で溶解した。次に、この溶液を、精製水で、4倍に希釈して、 γ -GTP濃度が141.5IU/Lになるよう調整した。さらに、各濃度の血清液を、キット付属の緩衝液で50倍に希釈して、熱レンズ測定の検体とした。測定の

ための光学系及びチップは、実施例1記載のものを用いた。また、各リザーバ及び廃液溜間の液面差の設定は、実施例1と同様にしておこなった。結果は図4に示すように、用量依存的な熱レンズ信号が得られた。

【0100】

【実施例3】＜傾斜送液での流速確認＞本実施例では、傾斜による重力送液の場合の、流速の安定度を測定した。チップとしては、図5のパターンをもつプリント基板チップを用いた。すなわち、厚み30 μ mの銅をもつプリント基板用銅板に、DFRを塗布し、図5の溝が形成されるマスクをかけてウェットエッチングをおこなった。その後、各液だめの位置に、直径1.5mmの貫通孔を、ドリルであけた。

【0101】このチップに、溝を内側にして、厚さ1mmのPMMAキャスト板を、両面テープ（日東電気工業株式会社製両面テープ MC-2030）で貼合わせた。図5において、液だめ1は検体用、液溜2は試薬1用、液溜3は試薬2用、液溜4は廃棄用である。5は熱レンズ信号を検出した位置を示す。溝の深さはすべて30 μ m、溝の幅と長さは実測値で、溝51：幅80 μ mで長さ30mm、溝52：幅80 μ mで長さ30mm、溝53：幅125 μ mで長さ55mm、溝54：幅125 μ mで長さ27mm、溝55（試薬2の合流点から熱レンズ検出位置まで）：幅185 μ mで長さ27mm、溝56：幅185 μ mで長さ約5mmである。このチップの各液溜に、実施例1と同様に、実施例1より小さい外付けの液溜を接着した。

【0102】流速確認液は、実施例1で用いたトータルコレステロール測定キットに付属している試薬2溶解液に、シュクロースを7重量%となるように添加し、直径3 μ mのラテックスビーズ懸濁液を1%混合して作成した。この液を、各液溜に各60 μ l添加し、液溜と流路を液で満たした後、検体溜、試薬1液溜、試薬2液溜から各々20 μ l抜き出し、廃液溜から40 μ lの液を抜き出した。この操作は、液溜表面を一旦濡らすために行った。流速の評価は、上記のようにセットアップしたチップを、水平から10度傾けて、キーエンス社のデジタルスコープを用いて、ビーズの速度を計測して行った。結果は、図6に示すように、各流路の流速は10分間以上ほとんど変化しなかった。同様の実験を計3回繰り返したが、図6から明らかなように、安定した流速が得られた。

【0103】

【実施例4】＜傾斜重力送液でのトータルコレステロール測定＞

（チップの作成）実施例3に記した方法で、しかし、マスクのポジネガを逆にして、プリント基板をウェットエッチングした。この場合は、チップの溝に相当する部分の銅が残り、その他の銅はエッチされなくなる。このプリント基板をマスターにして、真空下で1mm厚のPM

MA板をホットエンボス成形した。成形PMMAには、図7のパターンの流路が刻まれた。図7において、液だめ1は検体用、液溜2は試薬1用、液溜3は試薬2用、液溜4は廃棄用である。5は熱レンズ信号を検出した位置を示す。溝の深さはすべて30 μ m、溝の幅と長さは、溝71：幅30 μ mで長さ30mm、溝72：幅30 μ mで長さ30mm、溝73：幅30 μ mで長さ55mm、溝74：幅60 μ mで長さ27mm、溝75（試薬2の合流点から熱レンズ検出位置まで）：幅90 μ mで長さ27mm、溝76：幅90 μ mで長さ約5mmである。

【0104】成形後の板を1規定の硫酸で超音波洗浄し、残存する微量の銅を除去してから、各液だめの位置に、直径1.5mmの貫通孔を、ドリルであけた。このチップに、溝を内側にして、厚さ1mmのPMMAキャスト板を、両面テープ（日東電気工業株式会社製 MC-2030）で貼合わせた。

（検体および試薬の調整）実施例1と同じトータルコレステロール測定キットを用いて、実施例1と同様に試薬液を調整した。また、検体としては協和メディックス社脂質測定用標準血清の調製法を一部改変して調製した。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を付属の標準血清溶解液1672.5 μ lを用い溶解し、計算値でトータルコレステロールが400mg/dlになるように調製し、ストック溶液とした。次にストック溶液を付属の標準血清溶解液で希釈し、計算値で200mg/dl及び100mg/dl並びに50mg/dlのトータルコレステロールを含む溶液を調製した。この試料を、検出キット付属の試薬1用溶解液で35.5倍に希釈したものを検体とした。

【0105】（熱レンズ測定系）実施例1に記載した熱レンズ測定装置の内、倒立型顕微鏡（IX70、Olympus製）の下に、傾斜角度が調節できるステンレス製の台を挿入して、顕微鏡の観察ステージが、水平に対して10度傾くように調整した。このステンレス製台の外観図を図11に示す。顕微鏡の重さに対して変形しない厚み

（約25mm）のステンレス台本体111（台形の上底が330mm、下底が100mm、その間の辺の長さが485mm）に、傾斜度調節用ねじ112、113をねじ込んで、そのねじ込み度で、熱レンズ顕微鏡の傾斜度を調節し、その結果、この顕微鏡の観察ステージに固定したチップが所定の角度で傾斜することになり、傾斜による重力送液下での熱レンズ測定が可能となる。このステージに、顕微鏡に装置されている金属製のスライドグラスホルダーで、上記のチップを、所定の向きでしっかりと固定した。顕微鏡を傾けた後は、光学系を調整して、水平時と同様の信号がでることを確認してからコレステロールの計測を行った。

【0106】（トータルコレステロール測定）温度制御は実施例1と同様に、行った。また、各試薬および検体のチップへの添加は、各液溜に各60 μ l添加し、流

路を液で満たした後、検体溜、試薬1液溜、試薬2液溜から各々20 μ l抜き出し、廃液溜から40 μ lの液を抜き出すことにより行った。この操作は、液溜表面を一旦濡らすために行った。試薬及び検体を入れたチップを、10度傾斜の顕微鏡ステージに、廃液溜が下になるように固定して、送液を開始してから15分後に、熱レンズ測定を開始した。このようにして各コレステロール濃度での測定を行った結果、図8に示すように、直線性のよい用量依存性が得られた。

【0107】

【発明の効果】本発明の分析装置は、安価で簡便な重力を送液駆動力とし、定量的な送液が可能で、微細なキャピラリを有するチップと、高感度で小型化が容易な光熱変換検出装置とからなる分析装置であるため、安価で簡便かつ短時間に分析ができ、POC分析等に適した分析装置を提供できるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例1で使用したトータルコレステロール測定用の流路。

【図2】熱レンズ測定装置の説明図。

【図3】実施例1に記した液量調節による重力送液での、トータルコレステロール測定時の熱レンズ信号出力値。

【図4】実施例2に記した γ -GTP測定時の熱レンズ出力値。

【図5】実施例3で用いた流路。

【図6】実施例3に記した10度傾斜送液時の流速測定結果。

【図7】実施例4で用いた流路。

【図8】実施例4に記した10度傾斜送液によるトータルコレステロール測定時の熱レンズ出力値。

【図9】図5の流路に対応する計算モデル。

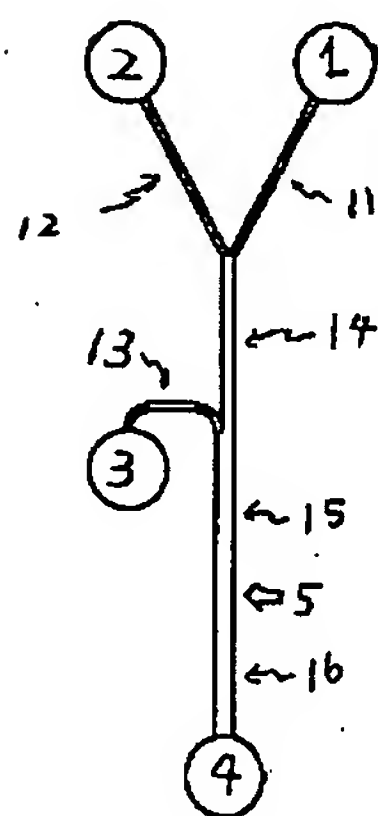
【図10】計算値と実測値の対応を示すグラフ。

【図11】熱レンズ顕微鏡を傾斜させる台。

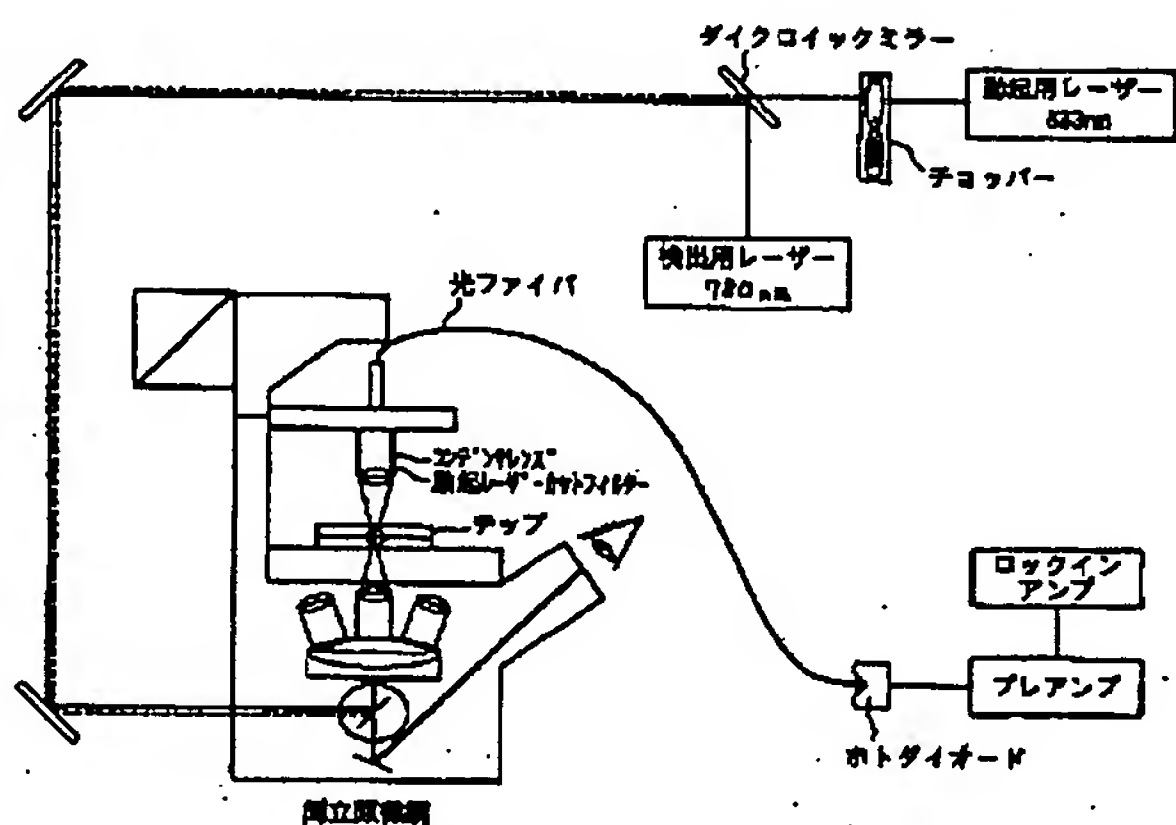
【符号の説明】

- 1 検体リザーバー。
- 2 試薬1リザーバー。
- 3 試薬2リザーバー。
- 4 廃液溜。
- 5 熱レンズ検出位置。
- 11~16 溝。
- 51~56 溝。
- 71~76 溝。
- 111 熱レンズ顕微鏡傾斜台本体。
- 112、113 傾斜度調節用ねじ。
- S 検体リザーバー。
- A 試薬1リザーバー。
- B 試薬2リザーバー。
- W 廃液溜。

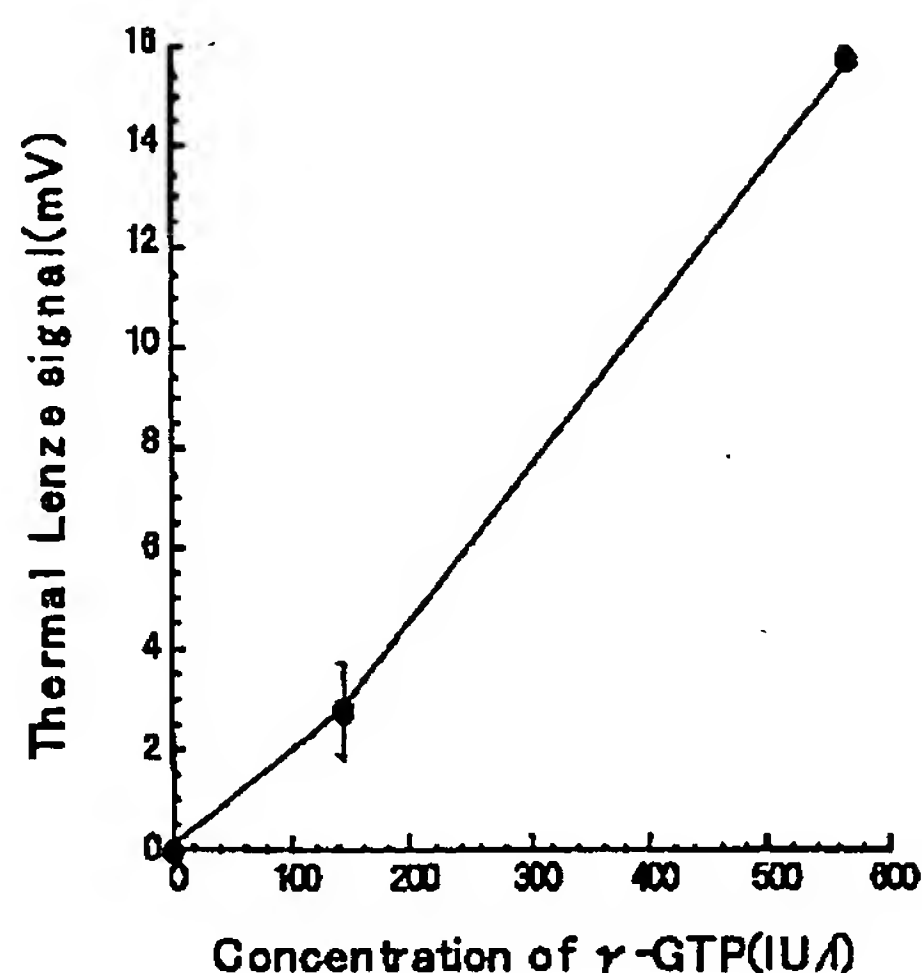
【図1】



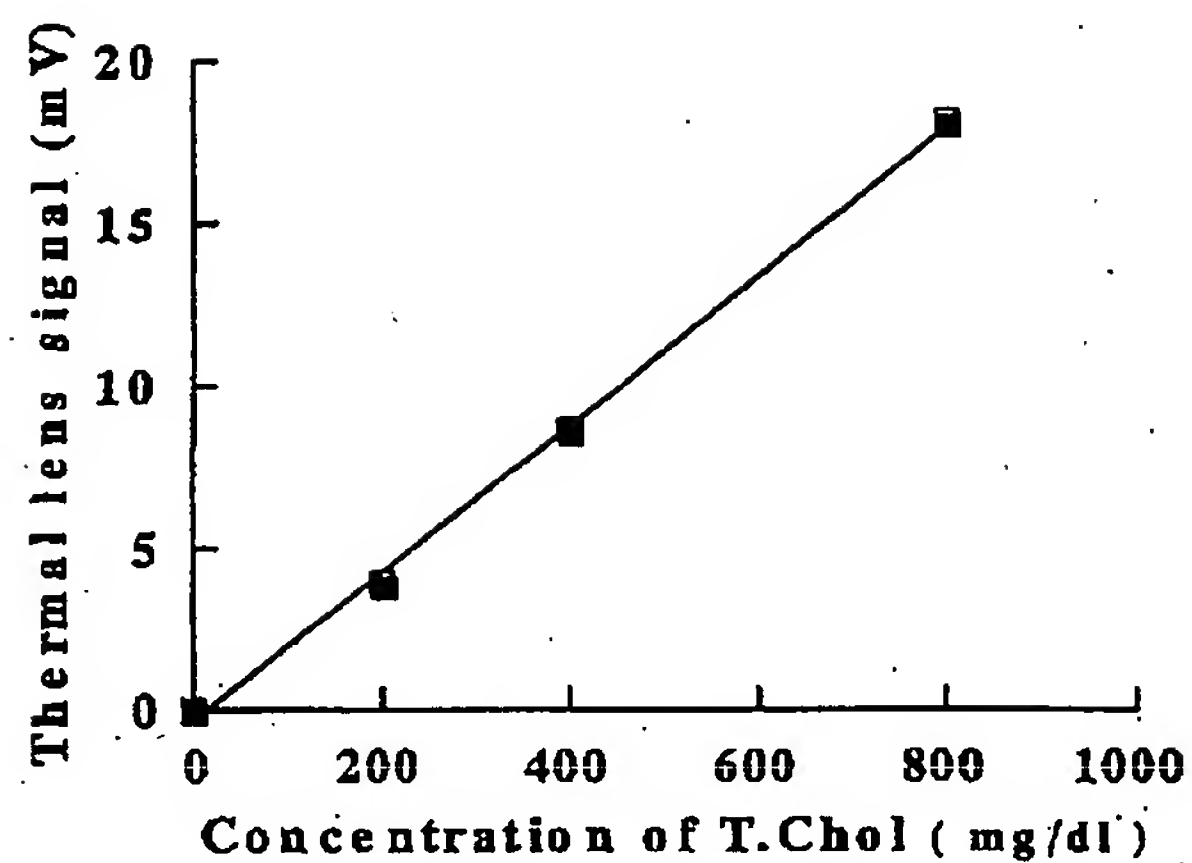
【図2】



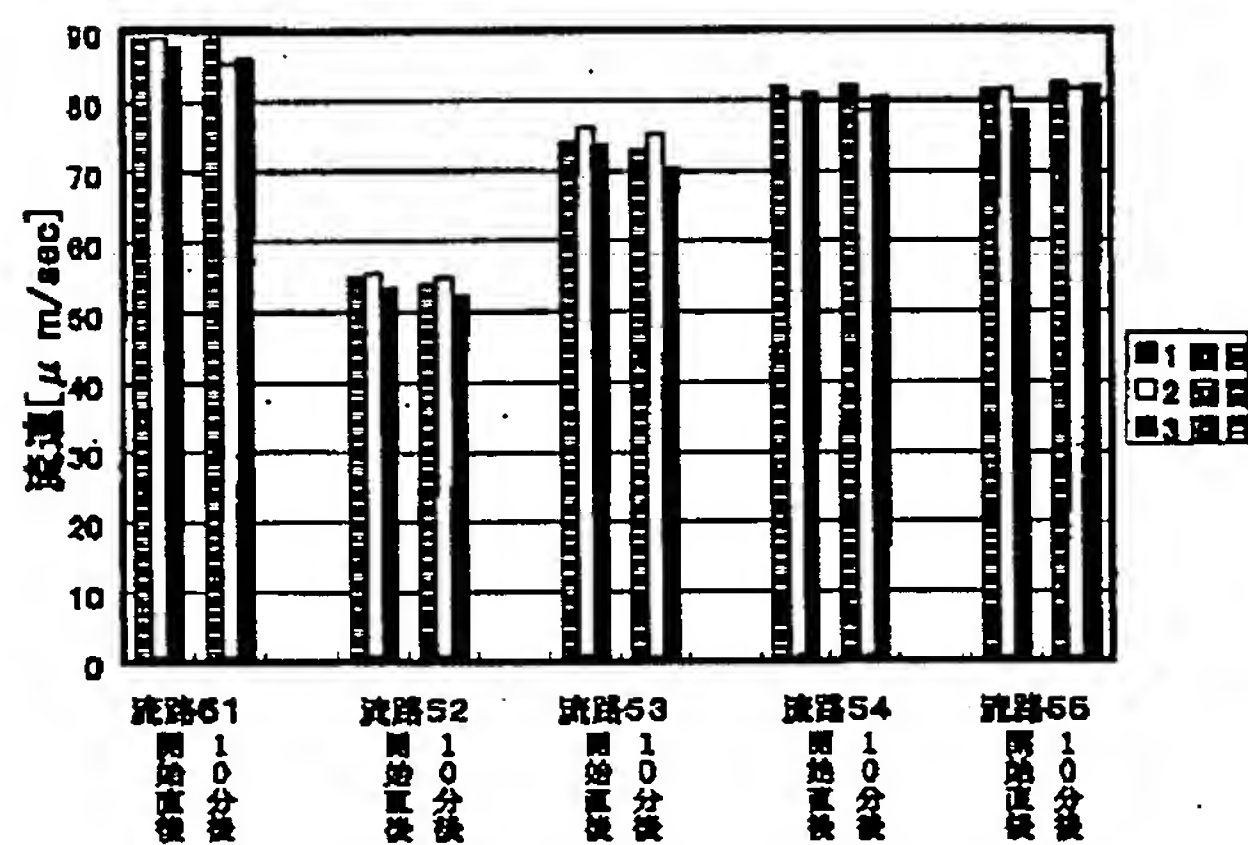
【図4】



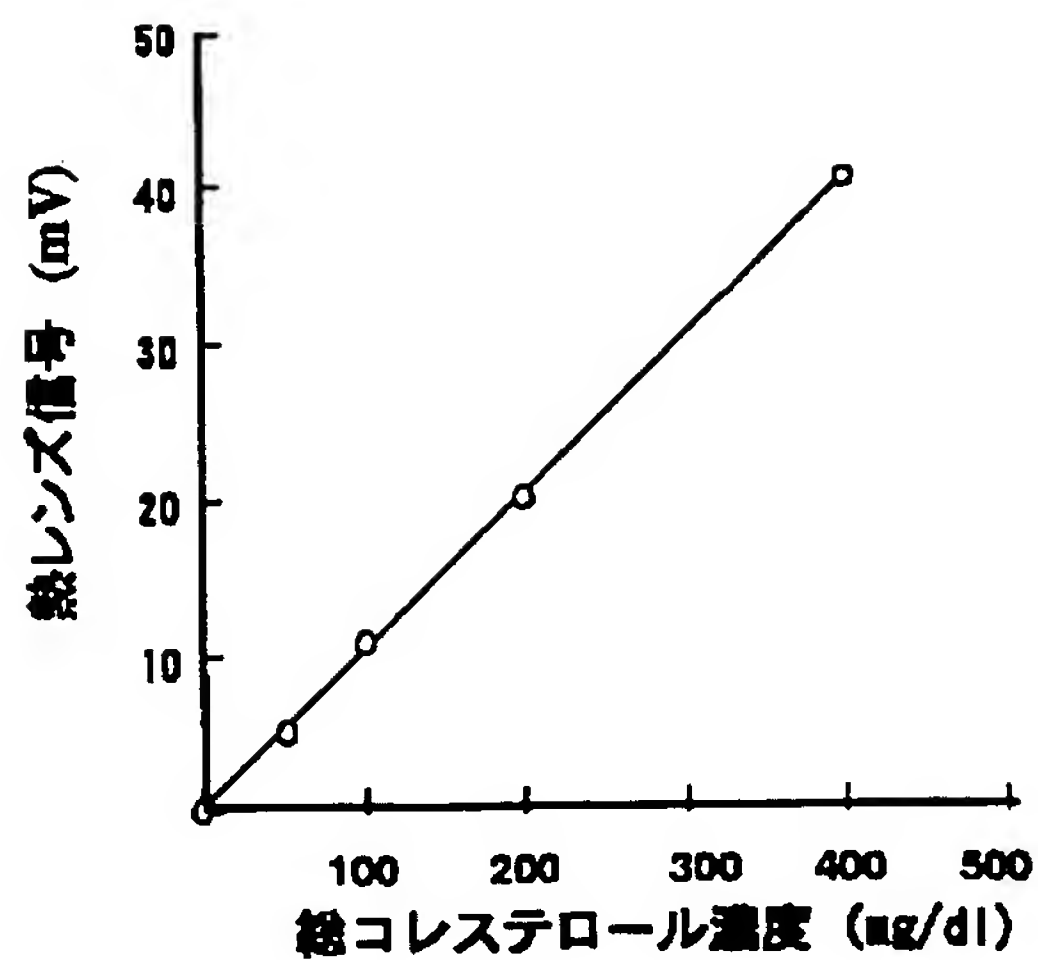
【図3】



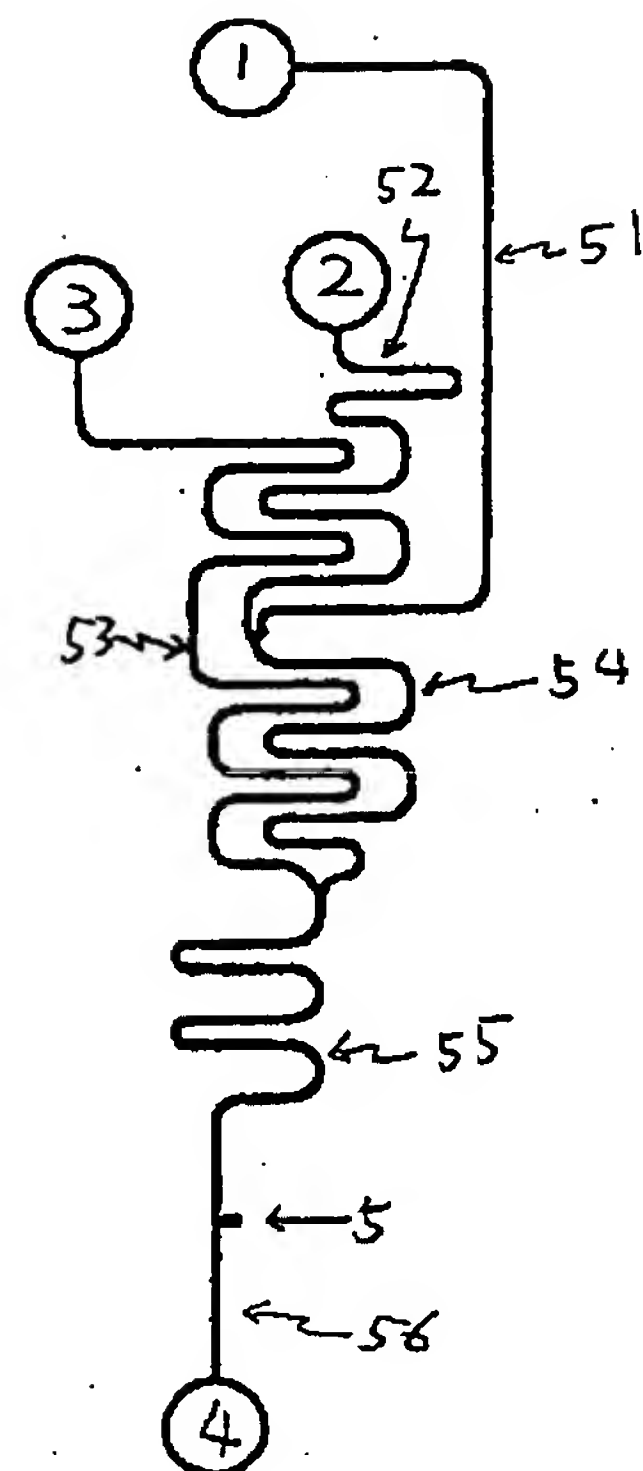
【図6】



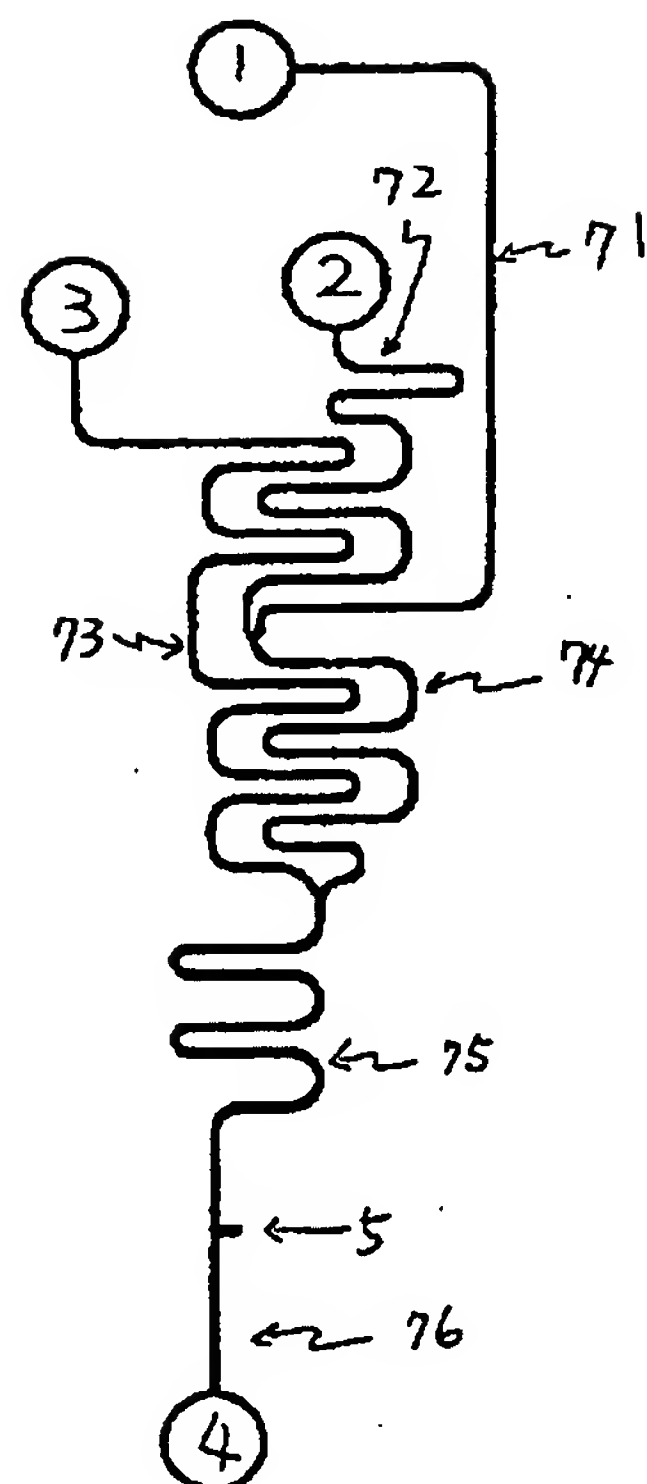
【図8】



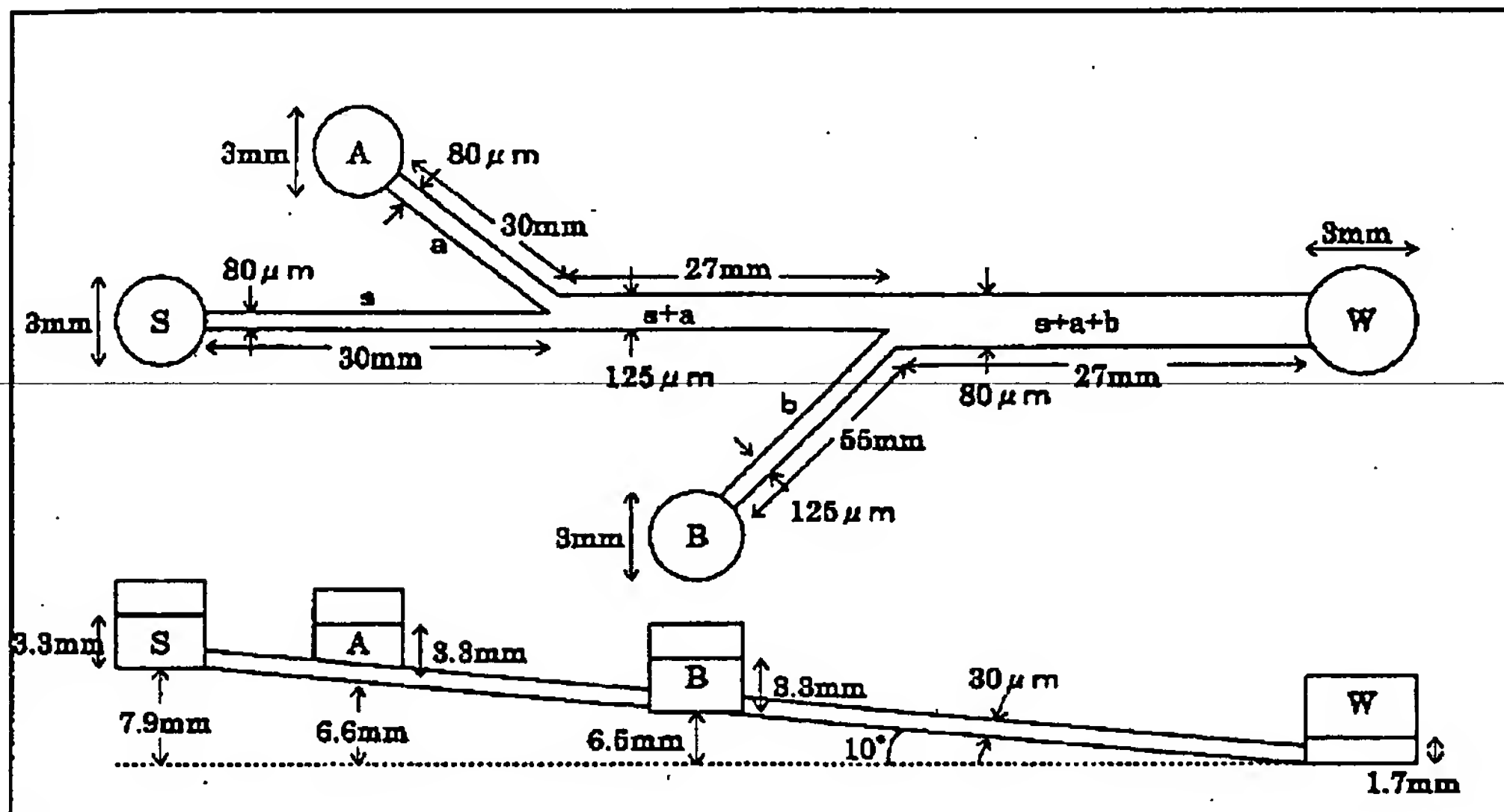
【図5】



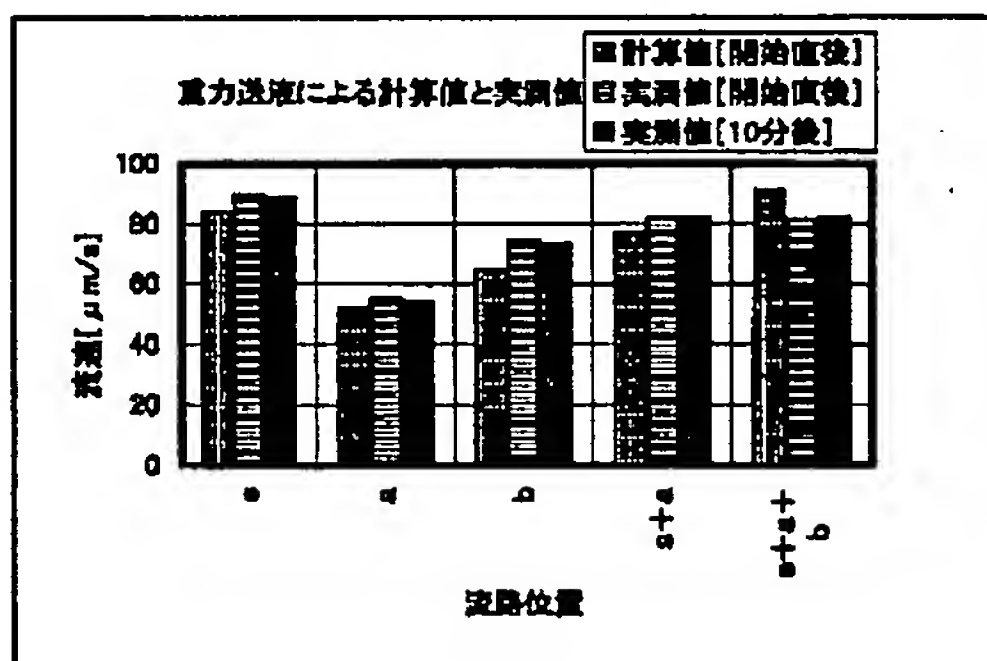
【図7】



【図9】



【図10】



【図11】

